



Alexandre Mulkowski Marta

Licenciado em Engenharia Química e Bioquímica

Desenvolvimento de suplemento alimentar multivitamínico

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Dra. Sandra Lopes, Laboratórios Atral, S.A.
Co-orientador: Prof. Dr. Mário Eusébio, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Dra. Isabel Maria Rôla Coelho, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Dra. Maria Teresa Malta Teixeira Santos, Direção Técnica, Laboratórios Atral S.A.

Vogal: Dra. Sandra Maria Pontes Brogueira Lopes, Desenvolvimento Galénico e Analítico, Laboratórios Atral S.A.



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro 2019

Alexandre Mulkowski Marta

Licenciado em Engenharia Química e Bioquímica

Desenvolvimento de suplemento alimentar multivitamínico

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Dra. Sandra Lopes, Laboratórios Atral, S.A.
Co-orientador: Prof. Dr. Mário Eusébio, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Dra. Isabel Maria Rôla Coelho, Faculdade de Ciências e
Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa
Arguente: Dra. Maria Teresa Malta Teixeira Santos, Direção Técnica,
Laboratórios Atral S.A.
Vogal: Dra. Sandra Maria Pontes Brogueira Lopes, Desenvolvimento Galénico
e Analítico, Laboratórios Atral S.A.

Outubro 2019

[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

PROJETO DE DESENVOLVIMENTO DE UM SUPLEMENTO ALIMENTAR MULTIVÍTIMINICO

Copyright © Alexandre Mulkowski Marta e Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade
Nova de
Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Concluída este percurso de cinco anos, está na altura de agradecer a todos os que me acompanharam, incentivaram e ajudaram de qualquer forma.

Em primeiro lugar, quero agradecer aos Laboratórios Atral S.A. por me terem dado esta brilhante oportunidade de conhecer o ambiente industrial. Não podia ter pedido uma melhor oportunidade do que esta, obrigado a todas as pessoas pela vossa simpatia e ajuda durante estes seis meses.

À minha orientadora, Dra. Sandra Lopes, um muito obrigado por todo o conhecimento partilhado, por todas as horas tiradas para me ajudar neste projeto, por ter confiado sempre no meu trabalho e pela oportunidade dada de integrar a sua equipa de trabalho.

Ao Prof. Dr. Mário Eusébio e a todo o corpo docente da FCT-UNL, obrigado por todos os ensinamentos e conselhos tanto profissionais como pessoais, que sem dúvida contribuíram para me ajudar a chegar até aqui.

À Joana Cecílio, minha “coorientadora”, um muito obrigado por todos os conselhos partilhados e por me relembrares sempre que não podia parar de trabalhar um único dia durante estes seis meses. Às Marias e à Helena agradeço todo o apoio dado no laboratório.

Por último, quero deixar um agradecimento especial à minha mãe e ao meu pai por tornarem estes cinco anos possíveis, por serem incansáveis ao meu lado e por sempre me incentivarem a ir até ao fim. Aos meus irmãos, primos, tios, avós e a todos os amigos do coração, um muito obrigado por todas as brincadeiras, apoio e carinho dado. À Cíntia Simões, obrigado por toda a tua dedicação, por sempre caminhares a meu lado e sempre acreditares em mim.

[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

Abstract

This dissertation describes the reformulation of a pharmaceutical product, corresponding to an oral multivitamin solution, in a dietary supplement. The developed multivitamin supplement results from the combination of fat soluble vitamins A, D and E, with a set of trace elements and excipients.

This study aimed to identify a formula with physical stability (without precipitate), chemical stability (minimal degradation of the critical component vitamin A) and microbiological stability (by maintaining the appropriate pH to the preservative chosen).

Development of the new formulation began with a preliminar solubility test, where it was found that the calcium trace element was critical to the formulation by creating a precipitate.

In order to optimize the formulation of the dietary supplement, a face-centered composite design (CCF) with 17 experiments and 3 levels per factor was applied. Thus, it was possible to evaluate the influence of critical factors (calcium chloride, butylhydroxytoluene and fat soluble vitamin E) on the target responses (variation of fat soluble vitamin A content, pH of the solution and precipitate formation).

Hereupon, it was possible to achieve the objective of the study by identifying the optimal formulation: formula with 20 mg/200mL of butylhydroxytoluene, 120 mg/200mL of fat soluble vitamin E and without the presence of any calcium salt. This formula gives a clear final product (without precipitate) with a pH value within the predicted range (4.0 – 4.5) and a fat soluble vitamin A degradation below the predicted indicative value (25%).

This study was supported in analytical methods, that were validated according to ICH methodology, for the determination of fat soluble vitamin A and E in the dietary supplement samples, which allowed these methods to be classified as accurate, precise and linear in the predicted ranges.

Key-words: fat soluble vitamin A, fat soluble vitamin E, calcium chloride, dietary supplement, a face-centered composite design, analytical validation of assay methods.

Resumo

Esta dissertação descreve a reformulação de um produto farmacêutico, correspondente a uma solução oral multivitamínica, num suplemento alimentar. O suplemento alimentar multivitamínico desenvolvido resulta da combinação das vitaminas lipossolúveis A, D e E, com um conjunto de oligoelementos e excipientes.

Este estudo teve como objetivo geral identificar uma fórmula do suplemento alimentar, com estabilidade física (sem formação de precipitados), química (degradação mínima do componente crítico: vitamina A) e microbiológica (através da manutenção do pH adequado ao agente conservante escolhido).

Iniciou-se o desenvolvimento da nova formulação com um ensaio preliminar de solubilidades, onde se detetou que o oligoelemento cálcio originava precipitado na formulação.

De modo a otimizar a formulação do suplemento alimentar, aplicou-se então um desenho composto centrado nas faces (CCF) com 17 experiências e 3 níveis por fator. Assim, foi possível avaliar a influência dos fatores críticos da formulação (concentração de cloreto de cálcio, butil-hidroxitolueno e vitamina E) nas respostas obtidas (variação do teor de vitamina A, pH da solução e formação de precipitado).

Foi assim possível atingir o objetivo do estudo através da identificação da formulação ótima: fórmula com 20mg/200mL de butil-hidroxitolueno, 120mg/200mL de vitamina E e sem sal de cálcio. Esta fórmula permite obter um produto final límpido (ausência de precipitado), com valor de pH dentro da gama prevista (4,0-4,5) e com nível de degradação da vitamina A inferior ao valor indicativo previsto (25%).

O estudo realizado apoiou-se em métodos analíticos de doseamento da vitamina A e vitamina E nas amostras do suplemento alimentar em estudo, validados de acordo com metodologia ICH, o que permitiu classificar estes métodos como exatos, precisos e lineares nas gamas de trabalho previstas.

Palavras-chave: vitamina A, vitamina E, cloreto de cálcio, suplemento alimentar, desenho composto centrado nas faces, validação analítica de métodos de doseamento

Índice

| | |
|---|-----|
| Parte A – Contextualização da dissertação | 1 |
| 1. Introdução | 3 |
| 1.1. Enquadramento..... | 3 |
| 1.2. Objetivos | 3 |
| 1.3. Laboratórios Atral S.A | 4 |
| 2. Revisão Bibliográfica..... | 7 |
| 2.1. Desenvolvimento e produção de medicamentos | 7 |
| 2.2. Desenvolvimento e produção de suplementos alimentares | 8 |
| 2.3. Líquidos orais..... | 10 |
| 2.4. Caracterização do suplemento alimentar multivitamínico | 11 |
| 2.5. Desenvolvimento de fórmulas galénicas | 13 |
| 2.6. Desenho experimental | 18 |
| Parte B – Reformulação de um suplemento alimentar | 25 |
| 3. Materiais e métodos | 27 |
| 4. Tratamento dos Resultados | 31 |
| 4.1. Testes de Solubilidade..... | 31 |
| 4.2. Aplicação do desenho experimental na otimização da formulação..... | 33 |
| 4.3. Definição e validação de métodos analíticos | 47 |
| 4.4. Discussão dos resultados | 49 |
| 5. Conclusões e propostas de trabalhos futuros..... | 51 |
| Referências Bibliográficas | 53 |
| Apêndices | 57 |
| Apêndice A – Exemplos de desenho de experiências aplicados em indústria farmacêutica... | 59 |
| Apêndice B – Modelos de otimização da fórmula do suplemento alimentar | 61 |
| Apêndice C – Validação analítica do método de doseamento de vitamina A..... | 101 |
| Apêndice D – Validação analítica do método de doseamento de vitamina E | 105 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 2.1 – Estrutura do <i>all-trans retinol</i> | 11 |
| Figura 2.2 – Desenho fatorial completo..... | 20 |
| Figura 2.3 – Desenho fatorial fracionado | 20 |
| Figura 2.4 – Desenho composto central | 21 |
| Figura 2.5 – Desenho Box-Behnken..... | 21 |
| Figura 2.6 – Desenho de mistura..... | 21 |
| Figura 4.1 – Resultados dos testes de solubilidade após 1 mês | 32 |
| Figura 4.2 – Amostra sem presença de cloreto de cálcio..... | 38 |
| Figura 4.3 – Amostras com nível máximo de cloreto de cálcio..... | 38 |
| Figura 4.4 – Tonalidade de amostras | 39 |
| Figura 4.5 – Gráficos de previsão – $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 25°C e 60% HR..... | 40 |
| Figura 4.6 – Gama ótima de valores – $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 25°C e 60% HR..... | 40 |
| Figura 4.7 - Gráficos de previsão – $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 40°C e 75% HR..... | 41 |
| Figura 4.8 - Gama ótima de valores – $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 40°C e 75% HR..... | 42 |
| Figura 4.9 – Gráficos de previsão – $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 43 |
| Figura 4.10 - Gama ótima de valores – $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 43 |
| Figura 4.11 - Gráficos de previsão – Valor de pH após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 45 |
| Figura 4.12 - Gama ótima de valores – Valor de pH após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 45 |
| Figura 4.13 - Gráficos de previsão – Valor de pH após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 46 |
| Figura B.1 – Parâmetros de ajuste iniciais – $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 25°C e 60% HR..... | 61 |
| Figura B.2 – Gráfico de resíduos - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 25°C e 60% HR..... | 62 |
| Figura B.3 – Valores observados vs previstos - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 25°C e 60% HR..... | 62 |
| Figura B.4 – Coeficientes iniciais - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 25°C e 60% HR..... | 63 |
| Figura B.5 – Coeficientes finais - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 25°C e 60% HR..... | 63 |
| Figura B.6 – Parâmetros de reajuste do modelo - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 25°C e 60% HR..... | 64 |
| Figura B.7 – Gráfico de resíduos final – $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 25°C e 60% HR | 65 |
| Figura B.8 – Valores observados vs previstos finais - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 25°C e 60% HR..... | 66 |
| Figura B.9 - Parâmetros de ajuste iniciais - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 40°C e 75% HR..... | 66 |
| Figura B.10 - Gráfico de resíduos - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 40°C e 75% HR..... | 67 |
| Figura B.11 - Valores observados vs previstos - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 40°C e 75% HR..... | 67 |
| Figura B.12 - Coeficientes iniciais - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 40°C e 75% HR..... | 68 |
| Figura B.13 - Coeficientes finais - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 40°C e 75% HR..... | 68 |

| | |
|---|----|
| Figura B.14 – Parâmetros de reajuste do modelo - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 40°C e 75% HR..... | 69 |
| Figura B.15 – Gráfico de resíduos final - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês 40°C e 75% HR..... | 70 |
| Figura B.16 – Valores observados vs previstos finais - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 40°C e 75% HR..... | 70 |
| Figura B.17 - Parâmetros de ajuste iniciais MLR - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 71 |
| Figura B.18 - Gráfico de resíduos MLR - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 25°C e 60% HR | 71 |
| Figura B.19 - Valores observados vs previstos MLR - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 72 |
| Figura B.20 - Coeficientes iniciais MLR - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 72 |
| Figura B.21 - Coeficientes finais MLR - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 73 |
| Figura B.22 – Parâmetros de reajuste do modelo MLR - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 73 |
| Figura B.23 - Parâmetros de ajuste iniciais PLS - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 75 |
| Figura B.24 - Gráfico de resíduos PLS - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 75 |
| Figura B.25 - Valores observados vs previstos PLS - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 76 |
| Figura B.26 - Coeficientes iniciais PLS - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 76 |
| Figura B.27 - Coeficientes finais PLS - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 77 |
| Figura B.28 – Parâmetros de reajuste do modelo PLS - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 77 |
| Figura B.29 - Parâmetros de ajuste iniciais - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 79 |
| Figura B.30 - Gráfico de resíduos - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 40 °C e 75% HR | 79 |
| Figura B.31 - Valores observados vs previstos - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 80 |
| Figura B.32 - Coeficientes iniciais - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 80 |
| Figura B.33 - Coeficientes finais - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 81 |
| Figura B.34 – Parâmetros de reajuste do modelo - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 81 |
| Figura B.35 – Gráfico de resíduos final - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses 40°C e 75% HR..... | 82 |
| Figura B.36 – Valores observados vs previstos finais - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 40 °C e 75% HR..... | 83 |
| Figura B.37 - Parâmetros de ajuste iniciais – Valor de pH após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 83 |
| Figura B.38 - Gráfico de resíduos - Valor de pH após 3 meses, 25°C e 60% HR | 84 |
| Figura B.39 - Valores observados vs previstos - Valor de pH após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 84 |
| Figura B.40 - Coeficientes iniciais - Valor de pH após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 85 |
| Figura B.41 - Coeficientes finais - Valor de pH após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 85 |

| | |
|---|-----|
| Figura B.42 – Parâmetros de reajuste do modelo - Valor de pH após 3 meses, 25°C e 60% HR... | 86 |
| Figura B.43 – Gráfico de resíduos final - Valor de pH após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 87 |
| Figura B.44 – Valores observados vs previstos finais - Valor de pH após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 88 |
| Figura B.45 - Parâmetros de ajuste iniciais – Valor de pH após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 88 |
| Figura B.46 - Gráfico de resíduos - Valor de pH após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 89 |
| Figura B.47 - Valores observados vs previstos - Valor de pH após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 89 |
| Figura B.48 - Coeficientes iniciais - Valor de pH após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 90 |
| Figura B.49 - Coeficientes finais - Valor de pH após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 90 |
| Figura B.50 – Parâmetros de reajuste do modelo - Valor de pH após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 91 |
| Figura B.51 – Gráfico de resíduos final - Valor de pH após 3 meses, 40 °C e 75% HR..... | 92 |
| Figura B.52 – Valores observados vs previstos finais - Valor de pH após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 92 |
| Figura B.53 - Parâmetros de ajuste iniciais – Quantidade de precipitado após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 93 |
| Figura B.54 - Gráfico de resíduos - Quantidade de precipitado após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 94 |
| Figura B.55 - Valores observados vs previstos - Quantidade de precipitado após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 94 |
| Figura B.56 - Coeficientes iniciais - Quantidade de precipitado após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 95 |
| Figura B.57 - Coeficientes finais - Quantidade de precipitado após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 95 |
| Figura B.58 – Parâmetros de reajuste do modelo - Quantidade de precipitado após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 96 |
| Figura B.59 - Parâmetros de ajuste iniciais – Quantidade de precipitado após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 97 |
| Figura B.60 - Gráfico de resíduos - Quantidade de precipitado após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 98 |
| Figura B.61 - Valores observados vs previstos - Quantidade de precipitado após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 98 |
| Figura B.62 - Coeficientes iniciais - Quantidade de precipitado após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 99 |
| Figura B.63 - Coeficientes finais - Quantidade de precipitado após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 99 |
| Figura B.64 – Parâmetros de reajuste do modelo - Quantidade de precipitado após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 100 |

| | |
|---|-----|
| Figura C.1 – Cromatogramas de seletividade da Vitamina A..... | 101 |
| Figura C.2 – Reta de regressão linear da Vitamina A..... | 102 |
| Figura C.3 – Fatores resposta <i>vs</i> concentração da Vitamina A..... | 103 |
| Figura C.4 – Resíduos <i>vs</i> concentração da Vitamina A..... | 103 |
| Figura D.1 – Cromatogramas de seletividade da Vitamina E..... | 105 |
| Figura D.2 – Reta de regressão linear da Vitamina E..... | 107 |
| Figura D.3 – Fatores resposta <i>vs</i> concentração da Vitamina E..... | 107 |
| Figura D.4 – Resíduos <i>vs</i> concentração da Vitamina E | 107 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 2.1 – Fatores que afetam a estabilidade da Vitamina A..... | 12 |
| Tabela 2.2 – Parâmetros de validação analítica de acordo com a categoria do método analítico..... | 15 |
| Tabela 3.1 – Equipamentos utilizados na parte B..... | 27 |
| Tabela 3.2 – Reagentes utilizados na parte B..... | 27 |
| Tabela 3.3 – Matérias-primas utilizadas na formulação do suplemento alimentar..... | 28 |
| Tabela 3.4 – Condições cromatográficas utilizadas na validação dos métodos analíticos de doseamento das vitaminas A e E..... | 29 |
| Tabela 4.1 – Resumo dos testes de solubilidade..... | 32 |
| Tabela 4.2 – Desenho experimental proposto para validação da formulação..... | 34 |
| Tabela 4.3 – Variação do teor de Vitamina A a 25°C e 60% HR..... | 35 |
| Tabela 4.4 - Variação do teor de Vitamina A a 40°C e 75% HR..... | 35 |
| Tabela 4.5 – Valor de pH a 25°C e 60% HR..... | 36 |
| Tabela 4.6 – Valor de pH a 40°C e 75% HR..... | 36 |
| Tabela 4.7 – Quantidade de precipitado a 25°C e 60% HR..... | 37 |
| Tabela 4.8 – Quantidade de precipitado a 40°C e 75% HR..... | 37 |
| Tabela 4.9 – Resumo do modelo da variação do teor de Vitamina A, após 1 mês a 25°C e 60% HR..... | 39 |
| Tabela 4.10 - Resumo do modelo da variação do teor de Vitamina A, após 1 mês a 40°C e 75% HR..... | 41 |
| Tabela 4.11- Resumo do modelo da variação do teor de Vitamina A, após 3 meses a 40°C e 75% HR..... | 42 |
| Tabela 4.12 – Formulação ótima do modelo da variação do teor de Vitamina A, após 3 meses a 40°C e 75% HR..... | 44 |
| Tabela 4.13 - Resumo do modelo do valor de pH, após 3 meses a 25°C e 60% HR..... | 44 |
| Tabela 4.14 – Formulação ótima do modelo do valor de pH, após 3 meses a 25°C e 60% HR..... | 46 |
| Tabela 4.15 – Resumo do modelo do valor de pH, após 3 meses a 40°C e 75% HR..... | 46 |
| Tabela 4.16 - Formulação ótima do modelo do valor de pH, após 3 meses a 40°C e 75% HR..... | 47 |
| Tabela 4.17 – Validação analítica do método de doseamento da Vitamina A..... | 48 |
| Tabela 4.18 - Validação analítica do método de doseamento da Vitamina E..... | 49 |

| | |
|---|-----|
| Tabela A.1 – Exemplos de desenho de experiências aplicados em desenvolvimento farmacêutico..... | 59 |
| Tabela B.1 – Análise de variância - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 25°C e 60% HR..... | 65 |
| Tabela B.2 - Análise de variância - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 1 mês, 40°C e 75% HR..... | 69 |
| Tabela B.3 - Análise de variância MLR - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 74 |
| Tabela B.4 - Análise de variância PLS - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 78 |
| Tabela B.5 - Análise de variância - $\Delta(\% \text{ Vit.A})$ após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 82 |
| Tabela B.6 - Análise de variância – valor de pH após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 87 |
| Tabela B.7 - Análise de variância – valor de pH após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 91 |
| Tabela B.8 - Análise de variância – quantidade de precipitado após 3 meses, 25°C e 60% HR..... | 96 |
| Tabela B.9 - Análise de variância – quantidade de precipitado após 3 meses, 40°C e 75% HR..... | 100 |
| Tabela C.1 – Resultados da seletividade da Vitamina A..... | 102 |
| Tabela C.2 – Resultados da linearidade da Vitamina A..... | 102 |
| Tabela C.3 – Resultados da precisão do sistema da Vitamina A..... | 103 |
| Tabela C.4 – Resultados da repetibilidade e precisão intermédia da Vitamina A..... | 104 |
| Tabela C.5 – Resultados da exatidão da Vitamina A..... | 104 |
| Tabela D.1 – Resultados da seletividade da Vitamina E..... | 106 |
| Tabela D.2 – Resultados da linearidade da Vitamina E..... | 106 |
| Tabela D.3 – Resultados da precisão do sistema da Vitamina E..... | 108 |
| Tabela D.4 – Resultados da repetibilidade e precisão intermédia da Vitamina E..... | 108 |
| Tabela D.5 – Resultados da exatidão da Vitamina E..... | 109 |

Acrónimos e abreviaturas

| | |
|--------|--|
| BHA | Butil-hidroxianisol |
| BHT | Butil-hidroxitolueno |
| BPF | Boas Práticas de Fabrico |
| Ca | Cálcio |
| CCF | Desenho Composto Central Centrado nas Faces |
| CQ | Controlo de Qualidade |
| CV | Coefficiente de Variação |
| DP | Desvio padrão |
| GQ | Gestão de qualidade |
| HACCP | Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| HR | Humidade Relativa |
| ICH | Conselho Internacional de Harmonização |
| LD | Limite de Detecção |
| LQ | Limite de Quantificação |
| MLR | Regressão Linear Múltipla |
| PCC | Ponto Crítico de Controlo |
| PLS | Mínimos Quadrados Parciais |
| UV | Ultravioleta |
| Vit. A | Vitamina A |
| Vit. E | Vitamina E |

Parte A – Contextualização da **dissertação**

1.Introdução

O presente trabalho, elaborado no âmbito da dissertação de mestrado em Engenharia Química e Bioquímica, pretende apresentar a reformulação de um suplemento alimentar multivitamínico.

1.1. Enquadramento

A Indústria Farmacêutica tem como principal objetivo a inovação através do desenvolvimento de novos produtos assim como a reformulação de produtos já existentes, indo ao encontro das necessidades do cliente e de modo a melhorar a saúde e qualidade de vida das populações. Destes produtos podem distinguir-se os medicamentos, cosméticos, suplementos alimentares e produtos corporais e de higiene corporal em diversas formas e vias de administração [1].

Para um medicamento ser comercializado, este tem de ser aprovado e é necessário obter a Autorização de Introdução no Mercado (AIM), fornecida pela autoridade regulamentar relativa a produtos farmacêuticos do país onde este será comercializado [2].

O mesmo acontece no caso dos suplementos alimentares apesar da autoridade regulamentar dos suplementos ser distinta da dos medicamentos. Neste caso a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) é responsável por regulamentar a aprovação do produto, pois estes são considerados géneros alimentícios, ainda que com algumas características especiais, como o facto de se apresentarem de formas doseadas, que se destinam apenas a complementar e/ou suplementar o regime alimentar normal, não devendo ser utilizados como substitutos de uma dieta variada [2-4].

1.2. Objetivos

Neste estudo pretende-se alterar a fórmula de um produto farmacêutico descontinuado, correspondente a uma solução oral multivitamínica, de forma a converter fórmula(s) farmacêutica(s) em fórmula(s) de suplemento alimentar. Esta alteração resulta da legislação específica aplicável apenas a suplementos alimentares, em particular, das normas relativas a aditivos autorizados nesta categoria de alimentos: Regulamento (UE) Nr. 1333/2008, atualizado pelo Regulamento (UE) 2018/ 1497 [5].

Na medida em que os medicamentos não são abrangidos pelas restrições qualitativas e quantitativas impostas nesta legislação, será necessário remover ou substituir aditivos não autorizados em suplementos alimentares.

Adicionalmente, nesta fórmula será necessário reajustar as sobrecargas de vitaminas lipossolúveis (A e E) de acordo com a legislação europeia aplicável a suplementos alimentares, que define limites mais apertados do que monografias oficiais aprovadas pela legislação norte-americana. Face à labilidade das vitaminas, será avaliada a necessidade de utilizar agentes que promovam a estabilidade destas vitaminas (por ex. antioxidantes) para garantir que cumprem o limite de teor mínimo aceitável no final do prazo de validade.

Sendo um suplemento alimentar considerado um género alimentício, torna-se essencial implementar paralelamente um sistema de Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (HACCP), sistema este que tem na sua base uma metodologia preventiva, com o objetivo de evitar potenciais riscos que podem causar danos aos consumidores, através da eliminação ou redução

de perigos, de forma a evitar que estejam colocados à disposição do consumidor alimentos, neste caso em específico, suplementos alimentares, não seguros.

O principal objetivo deste trabalho será então reformular fórmula(s) farmacêutica(s) de uma solução oral multivitamínica, através da remoção ou substituição dos aditivos não autorizados em suplementos alimentares (agentes solubilizantes e antimicrobianos), além da redução de sobrecargas de vitaminas lipossolúveis associada à utilização de agentes estabilizantes.

Com esta finalidade, foi inicialmente proposto que o desenvolvimento galénico e analítico do suplemento alimentar se divida nas seguintes fases:

1. Aplicação de um estudo de solubilidades;
2. Definição de propostas para formulação do suplemento alimentar;
3. Aplicação de desenho experimental na otimização da formulação;
4. Definição e validação de métodos analíticos.

A formulação qualitativa e quantitativa do produto farmacêutico descontinuado será utilizada como ponto de partida e assim, numa primeira fase, pretende-se identificar de um modo simplificado que componentes podem originar a formação de precipitado no suplemento alimentar num curto espaço de tempo - 1 mês de armazenamento a temperatura ambiente após eliminação de componentes solubilizantes incompatíveis com a legislação alimentar.

De modo a otimizar os restantes componentes da formulação, são realizados estudos (não experimentais) comparativos de outras fórmulas existentes no mercado assim como a partir de referências bibliográficas. Nestes estudos, a compatibilidade entre os componentes, solubilidades e quantidades ótimas de excipientes de acordo com as suas funções pretendidas são as principais características a ter em conta na definição da fórmula final a ser trabalhada no desenho experimental.

Numa terceira fase, é então implementado um desenho experimental, de modo a conhecer o impacto das variáveis críticas da formulação (previamente selecionadas) e a determinar a combinação ótima das mesmas. As respostas desta otimização permitem definir a formulação final do suplemento alimentar.

É também necessário que sejam definidos e validados os métodos analíticos a serem utilizados na quantificação de componentes críticos da formulação durante o processo de desenvolvimento e na avaliação de rotina do suplemento alimentar.

1.3. Laboratórios Atral S.A

Os Laboratórios Atral S.A. são um grupo farmacêutico especializado na produção de medicamentos. São a empresa pioneira em Portugal na produção de antibióticos e, atualmente, a sua produção cobre também outras áreas terapêuticas incluindo medicamentos sujeitos a receita médica, não sujeitos a receita médica, de uso veterinário e suplementos alimentares.

A empresa teve início em 1947 como Farmácia Atral no Bairro de Alcântara, em Lisboa. Em 1965, resultante de uma necessidade de fabricar as próprias matérias-primas, surge o “Grupo Atral Cipan” que inicia a produção de três novos fármacos inéditos no mercado nacional – tetraciclina, oxitetraciclina e eritromicina – nas novas instalações fabris na Vala do Carregado, Castanheira do Ribatejo. Esta parceria termina em 2016 quando a Atral é adquirida pelo grupo peruano Medifarma, existindo desde então os “Laboratórios Atral S.A.” e a “Cipan” como duas empresas autónomas.

Atualmente, os Laboratórios Atral S.A. vendem os seus produtos e serviços em Portugal e em vários mercados internacionais, sendo uma das principais companhias exportadoras no setor

farmacêutico. Adicionalmente, a empresa beneficia de contratos de fabricação para terceiros, oferecendo serviços como produção, embalagem, desenvolvimento ou de logística.

Quanto à produção, é possível distinguir três unidades industriais: unidade geral, unidade das penicilinas e unidade das cefalosporinas, onde são produzidos essencialmente fórmulas sólidas orais, fórmulas líquidas e pastosas e fórmulas injetáveis [6].

2.Revisão Bibliográfica

2.1. Desenvolvimento e produção de medicamentos

O titular de uma Autorização de Fabrico de produtos farmacêuticos deve produzi-los de modo a garantir que estejam adequados para a sua utilização prevista, satisfazendo os requisitos necessários para introdução do produto no mercado ou para utilização dos produtos em ensaios clínicos apropriadamente, não pondo em risco os pacientes devido à carência de segurança, qualidade ou eficácia dos produtos [7,8].

Para atingir este objetivo de qualidade, deve existir um Sistema de Qualidade Farmacêutica abrangente e devidamente implementado que inclua Boas Práticas de Fabrico (BPF) e uma Gestão de Qualidade (GQ) no processo de produção dos produtos farmacêuticos. Todos os constituintes do Sistema de Qualidade Farmacêutica devem ter recursos adequados, pessoal competente e ainda instalações e equipamentos em quantidade e qualidade apropriadas [7,8].

Boas Práticas de Fabrico

O conceito de Gestão de Qualidade engloba todos os assuntos que, individualmente ou coletivamente, têm influência na qualidade final do produto e tem como objetivo assegurar que os produtos farmacêuticos apresentem a qualidade exigida para o seu uso pretendido [7,8].

As BPF são uma parte da Gestão de Qualidade que asseguram que os produtos são consistentemente produzidos e controlados de acordo com os padrões de qualidade apropriados ao seu uso pretendido e conforme exigido pela Autorização de Fabrico ou Autorização de Fabrico de Medicamentos Experimentais e pela própria especificação do produto. Estas aplicam-se então tanto à produção como ao Controlo de Qualidade (CQ) de um produto [7,8].

O princípio fundamental da produção será que deve seguir procedimentos bem definidos que vão ao encontro das BPF de modo a obter produtos finais com os requisitos de qualidade necessários e estarem de acordo com as autorizações de fabricação e comercialização [7,8].

De uma forma geral, é essencial que toda a produção seja executada e supervisionada por pessoal competente, que todas as matérias-primas, recipientes e produtos finais devem ser verificados, documentados e etiquetados, tal como armazenados em condições apropriadas estabelecidas pelo fabricante e de forma a permitir a rotação de *stock*.

O CQ é a secção das BPF que tem como principal preocupação a amostragem e especificação dos medicamentos assim como proceder à execução de testes aos produtos farmacêuticos. Tem também como função participar na libertação dos medicamentos realizada pela direção técnica, garantindo sempre que não são lançados para o mercado sem que a sua qualidade seja considerada como satisfatória. O CQ não é limitado a práticas laboratoriais, devendo estar também envolvido em todas as decisões que dizem respeito à qualidade dos produtos. Como tal, para alcançar um bom funcionamento do CQ é essencial que este trabalhe de forma independente do setor da produção.

Nas BPF encaixam-se também as revisões periódicas de qualidade realizadas a todos os medicamentos autorizados, com o objetivo de verificar a consistência do processo de fabrico existente para cada medicamento, a adequação das especificações em vigor tanto para matérias-primas como para produtos acabados, para compreender as oscilações existentes no processo e

identificar melhorias no produto e no processo existente. Estas revisões devem ser realizadas e documentadas anualmente, tendo sempre em conta as revisões realizadas anteriormente.

Todo o Sistema de Qualidade Farmacêutica deve ser devidamente documentado e a sua eficiência monitorizada. Uma boa documentação passa a constituir uma parte essencial do sistema de gestão de qualidade e é a chave para operar em conformidade com os requisitos das BPF. Os vários tipos de documentação e respetivos suportes utilizados devem estar inteiramente definidos na GQ. A documentação pode ser apresentada em várias formas, incluindo base impressa, eletrónica ou fotográfica. O principal objetivo do sistema de documentação é então estabelecer, controlar, monitorizar e gravar todas as atividades que têm impacto direto ou indireto na qualidade dos produtos finais.

O correto fabrico de medicamentos depende diretamente das pessoas que trabalham nas indústrias farmacêuticas. Por esta razão, deve haver pessoal suficiente devidamente qualificado para concretizar as tarefas que são da responsabilidade do fabricante. Assim, as responsabilidades individuais devem permanecer registadas e serem perfeitamente compreendidas por todo o pessoal da fábrica. Todos os trabalhadores têm, portanto, o dever de estar cientes das Boas Práticas de Fabrico que os afetam e o direito a receber formação inicial e contínua da parte da entidade empregadora.

As instalações e equipamentos utilizados devem ser localizados, projetados, adequados e devidamente preservados de forma a satisfazer as operações a serem realizadas. A sua disposição e *design* devem ter como objetivo principal minimizar o risco de erros e permitir uma efetiva manutenção e limpeza de modo a evitar possíveis contaminações cruzadas, acumulações de poeiras ou sujidades e, no geral, qualquer efeito adverso à qualidade dos produtos.

De forma a proteger a saúde pública e dos animais, é necessário que estejam implementados procedimentos adequados de modo a que seja possível gravar, investigar e rever queixas que incluam um risco de defeito de qualidade nos medicamentos que se encontram no mercado e, se necessário, revogar imediatamente a venda desses produtos do mercado. Também na investigação e avaliação de produtos farmacêuticos com possíveis defeitos devem ser aplicadas as BPF, fazendo com que todo o processo de análise e decisão final sobre o produto esteja de acordo com o Sistema de Qualidade Farmacêutica.

Todos os trabalhadores, edifícios, equipamentos, produção, controlo de qualidade e distribuição de produtos devem ser inspecionados pela empresa periodicamente de modo a confirmar se estão conforme os princípios das BPF. Estas inspeções devem ser orientadas de forma independente e detalhada por pessoas qualificadas da empresa. Todas as autoinspeções realizadas devem igualmente ser registadas, ficando todas as eventuais não conformidades, observações e propostas de medidas corretivas ou preventivas, se aplicável, descritas nos registos.

2.2. Desenvolvimento e produção de suplementos alimentares

Os suplementos alimentares são definidos pela Diretiva 2002/46/EC do Parlamento Europeu como uma categoria específica da família dos produtos alimentares que se destinam a complementar o regime alimentar normal, comercializados em forma doseada, para serem tomados em quantidades reduzidas [9].

Os suplementos alimentares devem cumprir os requisitos de qualidade e segurança aplicáveis a todos os outros géneros alimentícios, cobertos pela legislação europeia relativa a todos os produtos alimentares.

De um modo geral, as normas para o desenvolvimento e produção de suplementos alimentares vão ao encontro das normas para os medicamentos, nos termos em que é necessário que seja implementado um sistema de GQ que englobe BPF, controlo e garantia de qualidade para que o produto final seja obtido com as especificações e qualidade exigidas. Assim sendo, é fundamental que todo o trabalho realizado seja documentado corretamente e que todos os edifícios, equipamentos, materiais, pessoal, serviços adotados e processos de produção, armazenamento e distribuição implementados sejam capazes de produzir consistentemente produtos acabados que permaneçam em conformidade com as suas especificações e estejam devidamente protegidos contra contaminações [10].

Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (HACCP)

Para além das Boas Práticas de Fabrico, para se produzir géneros alimentícios é também necessário introduzir um manual HACCP. Este é um sistema que deve ser utilizado pela indústria alimentar com a finalidade de obter garantias que os produtos são seguros para consumo de modo eficiente, confiável e económico, focando-se na prevenção de riscos em todo o processo, desde a entrada de matérias-primas até à distribuição, em vez de confiar apenas em testes ao produto final [10-12].

O sistema HACCP baseia-se na identificação de todos os perigos relacionados com a segurança para o consumidor que possam ocorrer ao longo de todo o processo de fabrico e na determinação de possíveis medidas preventivas. Este sistema apenas pode ser implementado se as BPF e todos os requisitos de higiene na indústria alimentar forem devidamente respeitados e praticados [10-12].

Para a implementação de um sistema HACCP, é essencial que haja uma equipa HACCP. A equipa HACCP deve ser constituída por membros de vários sectores da empresa, como por exemplo um microbiologista, um membro da gestão de qualidade e um membro do setor da produção. Todos os membros da equipa devem ter experiência profissional, conhecimento dos produtos e processos de fabrico implementados e conhecimentos de como implementar um sistema HACCP e os seus princípios. Apesar de todos os membros da equipa necessitarem de conhecimentos sobre o sistema, apenas um membro necessita de formação profissional obrigatória em HACCP. Esta equipa é responsável por realizar análises detalhadas dos aspetos operacionais da fábrica, desde os setores de produção, equipamentos utilizados e condições de trabalho até às metodologias, procedimentos de fabrico e utilização de equipamentos e de higienização utilizados. Assim, esta equipa deverá identificar os potenciais perigos existentes para o consumidor ao longo de todas as fases do processo de fabrico dos produtos.

Para este fim, a equipa deverá começar por proceder à descrição detalhada dos produtos abrangidos pelo manual, incluindo todas as matérias-primas a ser utilizadas, os materiais de embalagem e as características relevantes do produto final para além de uma breve descrição do produto, da sua validade e instruções de utilização. As condições de armazenagem e transporte também deverão ser descritas uma vez que podem influenciar a qualidade do produto.

Após a descrição do produto, deve proceder-se à elaboração de um fluxograma que descreva detalhadamente as sequências e interações de todas as etapas de fabrico assim como todas as entradas de matérias-primas e produtos intermediários ao longo do processo. Este deverá ser claro, conciso e conter todas as informações técnicas relativas ao processo de fabrico do produto em questão. Antes de proceder à análise de perigos, a equipa HACCP deverá confirmar o fluxograma ao longo de toda a fábrica de forma a garantir que este reflete a realidade.

Para a análise de perigos, é essencial ter em conta o histórico de reclamações, devoluções de lotes e os resultados das análises do produto acabado. A equipa é responsável por identificar todos os perigos, sejam eles físicos, químicos ou biológicos, existentes ao longo do processo e avaliá-los

quanto à sua probabilidade de ocorrência e severidade, tendo como obrigação analisar as possíveis medidas preventivas para o controlo desses perigos.

De seguida, a equipa deve identificar se cada perigo anteriormente analisado corresponde a um ponto crítico de controlo (PCC), ponto do processo de fabrico onde é necessário a aplicação de medidas preventivas de controlo sobre um ou mais parâmetros – tais como o aspeto visual, temperatura, concentração, pH, contaminação biológica, etc. – com o objetivo de reduzir ou eliminar os riscos para o consumidor.

Após a determinação dos PCC devem ser estabelecidos e verificados limites críticos para cada um deles, que devem ter por base a própria experiência da empresa, requisitos legais, estudos experimentais ou bibliografia fundamentada. Após a identificação dos limites críticos, a equipa HACCP deve implementar um sistema de monitorização em cada PCC existente, definindo de que modo cada PCC deve ser controlado, onde é controlado e quem fica responsável pela sua monitorização. Para o caso de os limites críticos serem ultrapassados, devem estar também estabelecidas e documentadas ações corretivas e procedimentos de verificação a serem tomadas pelos responsáveis.

2.3. Líquidos orais

Líquidos orais, do ponto de vista farmacêutico, são preparações homogêneas que contêm um ou mais princípios ativos com o objetivo de serem facilmente consumidas com ou sem diluição. Podem distinguir-se três diferentes grupos de líquidos orais: soluções, suspensões e emulsões [12].

As soluções orais têm, normalmente, um ou mais componentes ativos dissolvidos num veículo adequado. A baixa solubilidade em água de alguns componentes pode ser aumentada através da adição de co solventes solúveis em água, através da adição de ácidos ou bases, pela adição de surfactantes não iónicos e por complexação (por exemplo, adição de agentes quelantes) [12].

Os solutos e solventes das soluções podem ser gases, líquidos ou sólidos, sendo que os sistemas líquido-líquido e sólido-líquido são os utilizados na formulação deste suplemento em específico.

Em comparação com formas sólidas, os líquidos orais têm certas vantagens, nomeadamente [12]:

- O ingrediente ativo é mais facilmente absorvido;
- Líquidos são mais fáceis de ingerir em comparação com cápsulas e comprimidos, especialmente quando os produtos são direcionados para crianças ou idosos;
- As irritações gástricas – efeitos secundários de alguns fármacos na forma sólida oral – podem ser reduzidas ou eliminadas na respetiva forma líquida.

Em compensação, existem também algumas desvantagens na preparação de líquidos orais:

- Os princípios ativos podem ser menos estáveis em formulações líquidas;
- Os líquidos são mais suscetíveis a contaminações microbianas;
- Disfarçar o sabor desagradável dos medicamentos é mais difícil em líquidos;
- As fórmulas líquidas são geralmente mais volumosas, ocupando mais espaço no armazenamento e transporte;
- A administração da dosagem correta não é tão precisa como em fórmulas sólidas em função do tipo de medidores de volume utilizados (colheres, conta-gotas, etc);
- As suspensões e emulsões têm a desvantagem extra de ser necessário agitar de modo a homogeneizar completamente a solução, para que a dosagem certa seja administrada.

2.4. Caracterização do suplemento alimentar multivitamínico

O suplemento alimentar a desenvolver neste projeto consiste numa combinação das vitaminas A, D e E, além de oligoelementos (incluindo o cálcio) e um conjunto variado de excipientes. No conjunto de excipientes, destaca-se o agente conservante sorbato de potássio.

O presente trabalho tem como ponto de partida dois componentes críticos da nova formulação: a vitamina A (na forma de palmitato de retinol) e o oligoelemento cálcio (na forma de diferentes sais), associados a problemas de estabilidade química e física respetivamente, em estudos preliminares da nova formulação do suplemento alimentar.

2.4.1. Vitamina A

Caracterização

A vitamina A é uma vitamina lipossolúvel, que se encontra naturalmente nos alimentos. É bastante importante para a visão, sistema imunitário e para a reprodução [13].

Podem distinguir-se dois tipos de vitamina A: a vitamina A que se encontra já formada nos tecidos animais e a provitamina A que se encontra presente em frutas e vegetais [14].

A sua descoberta remonta a 1913, quando McCollum and Davis relataram a presença de uma substância lipídica na manteiga e na gema de ovo que era necessária para o crescimento de ratos. Em 1916, a substância é nomeada de lipossolúvel A e associada pela primeira vez à xeroftalmia em crianças, surgindo assim a primeira funcionalidade desta vitamina [13].

Tem como funções manter os dentes, músculo esquelético e pele saudáveis. É ainda mais conhecida por produzir pigmentos na retina do olho e por promover uma boa visão, especialmente em ambientes escuros [13].

Propriedades físico-químicas

A vitamina A engloba todos os compostos isoprenóides que possuam a atividade biológica do *all-trans-retinol*. São estes o retinol, o ácido retinóico, o retinal e os carotenóides. Todos os isómeros de vitamina A possuem na sua estrutura um anel de beta-ionona por onde se liga a cadeia de isoprenóides, Figura 2.1.

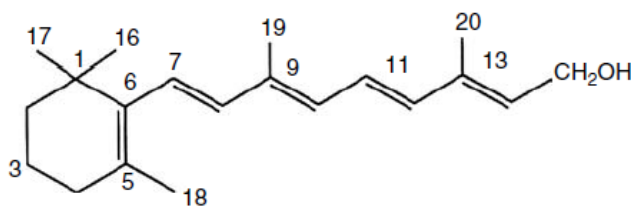


Figura 2.1 - Estrutura do *all-trans-retinol*

A oxidação do *all-trans-retinol* leva à formação de *all-trans-retinal* e oxidações adicionais levam à formação de *all-trans-ácido retinóico*. A vitamina A é insolúvel em água e solúvel em óleos, gorduras e em solventes orgânicos, sendo o acetato e palmitato de retinol as principais formas de vitamina A disponíveis em indústrias farmacêuticas e alimentares.

É das vitaminas mais facilmente oxidáveis, visto ser bastante afetada pela temperatura, luz ultravioleta (UV), presença de oxigênio e outros agentes oxidantes (por exemplo ferro e cobre). Por este motivo, o seu manuseamento e armazenamento deve ter todos estes aspetos em conta, tornando-se essencial armazenar produtos acabados com vitamina A ao abrigo da luz solar, embalados sob vácuo ou em atmosfera de azoto e tendo em conta que a degradação deste componente aumenta com a sua temperatura de armazenamento [13,15,16].

Na Tabela 2.1 é feita então uma descrição dos fatores que podem afetar diretamente a sua estabilidade. É possível verificar que os fatores luz (UV), agentes oxidantes, temperatura, oxigênio e pH inferior a 7 afetam bastante a estabilidade desta vitamina [13, 15-17].

Tabela 2.1 - Fatores que afetam a estabilidade da vitamina A, adaptado de [15]

| Temperatura | Luz (UV) | Oxigénio | Humidade | pH < 7 | pH > 7 | Agentes oxidantes | Agentes redutores | Iões metálicos |
|-------------|----------|----------|----------|--------|--------|-------------------|-------------------|----------------|
| .. | ... | .. | . | .. | . | ... | . | . |

• Pouco sensível; •• Sensível; ••• Muito Sensível

A degradação da vitamina A é fomentada pelo aumento da temperatura e o butil-hidroxitolueno (BHT), o butil-hidroxianisol (BHA) e a vitamina E são os agentes antioxidantes mais adequados a garantir a estabilidade desta vitamina [13,17,18].

É de notar também que, segundo Y. O. Li et al [17], a degradação da vitamina A é proporcionalmente direta ao tempo de armazenamento das amostras em que se encontra contida, seguindo uma cinética de primeira ordem.

2.4.2. Cálcio

O cálcio é o mineral mais abundante no corpo humano e é um eletrólito essencial do organismo. Porém, a definição das necessidades básicas de cálcio é difícil de identificar, pois varia de país para país e de cultura em cultura [19].

A quantidade de cálcio absorvida pelo corpo varia consoante vários fatores, tais como as necessidades do organismo, mas normalmente são absorvidos 30% a 40% da quantidade de cálcio ingerida [19].

A fonte de alimentação mais rica em cálcio é o leite e os seus derivados, estando também presente em vegetais, farinha, espinhas de peixes e água mineralizada, sendo que a falta deste mineral no organismo pode provocar doenças como hipocalcemia ou osteoporose [19].

Em produtos farmacêuticos e suplementos alimentares, o cálcio é normalmente utilizado sob a forma de sal (glicerofosfato, gluconato, cloreto, etc).

Este oligoelemento possui a particularidade de apresentar baixos valores de solubilidade em água e, portanto, a sua utilização em soluções orais é dificultada. Dos vários sais de cálcio existentes, o cloreto é o mais solúvel em água, sendo, portanto, o mais apropriado para o suplemento alimentar deste estudo. Por outro lado, este é o sal de cálcio mais irritante para o organismo [19].

2.4.3. Outros fatores (pH)

Para além da degradação da vitamina A e da potencial precipitação do cálcio, é necessário ter em conta também o pH da solução, que segundo o *Handbook of Pharmaceuticals Excipients* deverá estar entre 4 e 4,5 de modo a otimizar a função do agente antimicrobiano utilizado na formulação, sorbato de potássio [20].

2.5. Desenvolvimento de fórmulas galénicas

2.5.1. Estudos de pré-formulação e formulação

O desenvolvimento de fórmulas galénicas deve dividir-se em estudos de pré-formulação e estudos de formulação de modo a obter informação básica sobre as substâncias ativas e excipientes utilizados. Estes estudos têm como principal objetivo alcançar um produto de qualidade e o respetivo processo de fabrico [12,21,22].

Os estudos de pré-formulação de fórmulas galénicas englobam:

- **Estudo da compatibilidade entre todos os componentes da formulação** – estudos de compatibilidade entre substâncias ativas e excipientes, entre substâncias ativas e entre excipientes [12,21,22];
- **Caraterização físico-química das substâncias ativas e dos excipientes** – avaliação e caraterização das propriedades físico-químicas. As mais importantes a estudar para soluções orais são a solubilidade, a dependência de pH e a estabilidade dos componentes, no caso dos excipientes é necessário estudar também a função e concentração adequada de cada um [12,21,22].

Os estudos de formulação, que visam a otimização da fórmula galénica, englobam:

- **Atribuição dos principais atributos e especificações do produto;**
- **Atribuição de sobrecargas** – A sua inclusão deve ser fundamentada por razões de segurança e eficácia do produto, não excedendo os limites de especificação impostos [12,21,22];
- **Análise das propriedades físico-químicas e farmacotécnicas** – demonstrar a estabilidade da fórmula galénica, relativamente a parâmetros que variam consoante a forma farmacêutica do produto. Em soluções orais os principais parâmetros a avaliar são os carateres organoléticos (limpidez, coloração do líquido e sabor), o pH, o doseamento de substâncias ativas e determinação de produtos de degradação, o teor de conservantes se aplicável e a contaminação microbiana [12,21,22].

2.5.2. Estudos de estabilidade

Um suplemento alimentar, à semelhança de um produto farmacêutico, deve ser avaliado em condições de armazenamento que testem a sua estabilidade térmica e sensibilidade à humidade. As condições de conservação e o tempo de armazenamento utilizadas nestes estudos devem ser suficientes para cobrir o armazenamento, o transporte e a utilização final do produto [23].

Para produtos que não necessitem de refrigeração, podem ser realizados três tipos de testes de estabilidade:

- **Longo termo** - armazenamento do produto em estudo a 25°C e 60% de humidade relativa (HR) ou 30°C e 65% HR durante um período correspondente ao prazo de validade proposto [23];
- **Intermédio** – armazenamento a 30°C e 65% HR durante 12 meses (apenas aplicável se no teste de longo termo forem aplicadas as primeiras condições mencionadas) [23];
- **Estabilidade acelerada** – armazenamento a 40°C e 75% HR durante 6 meses [23].

O registo inicial dos produtos poderá ser feito com estudos de estabilidade ainda a decorrer, desde que sejam respeitados os tempos mínimos estabelecidos pela autoridade regulamentar aplicável (geralmente, 12 meses para estudos de longo termo).

2.5.3. Definição e validação de métodos analíticos

O principal objetivo da validação de um método analítico é demonstrar que este é adequado à sua finalidade através de estudos laboratoriais [24,25].

Os métodos analíticos são usados para diferentes objetivos, consequentemente, os parâmetros analíticos a estudar num processo de validação deverão ser escolhidos de acordo com a categoria em que se insere o método a validar [24,25]:

- I. **Doseamento** – determinação quantitativa de um componente principal presente numa amostra;
- II. **Teor de impurezas** – determinação da pureza da amostra através de:
 - **Ensaio quantitativo:** determinação do teor de impurezas numa amostra;
 - **Ensaio limite:** determinação se teor de impurezas estão em quantidades superiores ou inferiores aos limites de especificação;
- III. **Ensaio de desempenho** – determinação das características físico-químicas de desempenho de uma amostra (por exemplo ensaios de dissolução);
- IV. **Ensaio de identificação** – identificação de um componente numa amostra por comparação de uma propriedade da amostra com um padrão.

Os parâmetros a validar para cada uma das categorias são definidos na Tabela 2.2 [24,25]:

Tabela 2.2 - Parâmetros de validação analítica de acordo com a categoria do método analítico em estudo

| Parâmetro analítico a validar | Categoria I Doseamento | Categoria II | | Categoria III Desempenho | Categoria IV Identificação |
|--------------------------------|---------------------------|-----------------|-----------|-----------------------------|-------------------------------|
| | | a) Quantitativo | b) Limite | | |
| Seletividade | Sim | Sim | Sim | Opcional* | Sim |
| Exatidão | Sim | Sim | Opcional* | Opcional* | Não |
| Precisão | | | | | |
| Precisão do sistema | Sim | Sim | Não | Não | Não |
| Repetibilidade | Sim | Sim | Não | Sim | Não |
| Precisão intermédia | Sim | Sim | Não | Opcional* | Não |
| Limite de detecção | Não | Opcional* | Sim | Opcional* | Não |
| Limite de quantificação | Não | Sim | Não | Opcional* | Não |
| Linearidade | Sim | Sim | Não | Opcional* | Não |
| Gama de trabalho | Sim | Sim | Opcional* | Opcional* | Não |
| Estabilidade a solução | Sim | Sim | Sim | Sim | Não |
| Robustez | Opcional* | Opcional* | Não | Não | Não |

*Pode ser necessário efetuar o parâmetro dependendo da natureza do teste.

Seletividade

Por seletividade entende-se a capacidade do método para detetar o analito na presença de outros componentes potencialmente presentes na amostra, tais como impurezas, produtos de degradação e outros componentes da matriz em estudo [24,25].

A falta de seletividade de um método analítico pode ser compensada por outros métodos analíticos de apoio, podendo ser necessário neste caso o uso de dois ou mais métodos de modo a garantir o nível de seletividade necessário [24,25].

Para avaliar o parâmetro da seletividade é necessário efetuar a análise de amostras de produto acabado e dos seus vários componentes individualmente – solventes, substâncias ativas/componentes principais, excipientes, impurezas e produtos de degradação – de modo a determinar o grau de interferência entre eles [24,25].

No caso de métodos cromatográficos, a seletividade é demonstrada pela resolução entre os dois picos cromatográficos mais próximos. Podem ainda ser utilizados testes que demonstrem a pureza do pico cromatográfico atribuído ao analito, com por exemplo através de detetores de foto-díodos ou de espetrometria de massa [24,25].

Exatidão

A exatidão de um método analítico expressa a aproximação dos resultados analíticos obtidos por esse método ao valor aceite como real e deve ser estabelecida em toda a gama de trabalho [24,25].

A exatidão deve ser estabelecida com base em 9 amostras, em pelo menos 3 níveis de concentração (3 réplicas por nível) correspondentes ao limite inferior, intermédio e superior da gama de trabalho [24,25].

Em formas farmacêuticas, deve proceder-se à preparação de um placebo da fórmula galénica – conjunto de excipientes – de modo a serem preparadas amostras com concentrações conhecidas de analito na gama de trabalho [24,25].

Os resultados da exatidão deverão ser expressos como percentagem de recuperação de analito ou pela diferença entre o valor médio e o valor aceite como real [24,25].

Precisão

A precisão de um método analítico reside no grau de concordância entre os resultados analíticos obtidos pela aplicação sucessiva do método a múltiplas tomas de uma amostra homogénea [24,25].

Os resultados da precisão deverão ser expressos através do coeficiente de variação para cada conjunto de determinações efetuado e para o conjunto global de determinações efetuado [24,25].

A precisão deverá ser avaliada em três níveis [24,25]:

- **Precisão do sistema:** expressa a variação introduzida apenas pelo sistema analítico utilizado, nas mesmas condições experimentais e num curto intervalo de tempo, ou seja, executando análises múltiplas da mesma amostra (normalmente uma solução padrão na concentração de trabalho) [24,25];
- **Repetibilidade:** expressa a variação do método num curto intervalo de tempo, mantendo constantes todas as condições experimentais, ou seja, executando análises múltiplas de diferentes alíquotas de uma amostra homogénea, mantendo constante a concentração alvo [24,25];
- **Precisão intermédia:** mede a variação do método, variando as condições experimentais tais como o dia de análise, o analista e o equipamento [24,25];
- Em casos específicos, é também necessário aplicar a **reprodutibilidade**, sendo também necessário variar o laboratório de análise [24,25].

Limites de deteção e quantificação

O limite de deteção (LD) consiste na menor concentração de analito que o método permite detetar, mas não necessariamente quantificar, nas condições experimentais estabelecidas para o método analítico [24,25].

O limite de quantificação (LQ) consiste na menor concentração de analito que o método permite quantificar com um grau de exatidão e precisão adequados, nas condições experimentais estabelecidas para o método analítico [24,25].

Os limites de deteção e quantificação podem ser determinados das seguintes formas [24,25]:

- Avaliação visual, em métodos não instrumentais e também instrumentais no caso de LD;
- Razão sinal/ruído de 3:1 para o LD e 10:1 para o LQ;
- Através do cálculo baseado no desvio padrão da resposta e no declive da curva de calibração:

$$LD \text{ ou } LQ = \frac{F * \sigma}{S}$$

Onde,

$F = 3,3$ e 10 para LD e LQ, respetivamente;

σ corresponde ao desvio padrão da amostra;

S corresponde ao declive da curva de calibração do analito.

Quando os limites de deteção e quantificação são obtidos por extrapolação (da curva de calibração), deverão ser posteriormente confirmados através da análise de um número significativo de amostras com uma concentração próxima dos respetivos limites [24,25].

Linearidade

A linearidade de um método analítico representa a sua capacidade de obter respostas analíticas, diretamente ou através de uma transformação matemática, proporcionais à concentração de analito, na gama de trabalho do método analítico [24,25].

A linearidade pode ser avaliada por aplicação do método a diferentes tomas de uma formulação idêntica à do produto em estudo ou a diferentes tomas do analito em estudo, através de diferentes diluições de uma solução padrão [24,25].

Para estabelecimento da linearidade, devem ser executados pelo menos 5 níveis de concentração, distribuídos uniformemente ao longo de toda a gama de trabalho do método [24,25].

A análise deste parâmetro deverá ser efetuada por uma representação gráfica das respostas obtidas em função da concentração de analito. Caso exista uma relação linear, os resultados deverão ser acompanhados de parâmetros estatísticos, tais como o coeficiente de regressão linear, o declive da reta de regressão, a ordenada na origem e o respetivo intervalo de confiança e o quociente entre resposta e concentração de analito para cada nível de concentração estudado (fator de resposta) [24,25].

Gama de trabalho

A gama de trabalho é o intervalo em que se verificam os parâmetros de exatidão, precisão e linearidade adequados para o método analítico em estudo e é normalmente expressa nas mesmas unidades que os resultados dos testes, por exemplo em percentagem [24,25].

A amplitude deste intervalo depende da finalidade do método analítico, sendo que os limites normalmente aceites por categoria são os seguintes [24,25]:

- Doseamento de matéria-prima/produto acabado: 80% a 120% da concentração de trabalho;
- Determinação de impurezas: do limiar de apresentação (“reporting threshold”) até 120% dos critérios de aceitação;
- Uniformidade de teor: 70% a 130% da concentração de trabalho;
- Quantificação de ensaios de dissolução: $\pm 20\%$ da especificação de teor dissolvido no final do ensaio.

Estabilidade das soluções analíticas

A estabilidade das soluções analíticas após um período de tempo, indica a capacidade da solução analítica fornecer, após esse mesmo período de tempo, uma resposta com uma variação inferior ao critério especificado comparativamente à resposta obtida no tempo 0 [24,25].

A estabilidade das soluções deverá ser estudada em pelo menos duas condições de temperatura diferentes, normalmente uma amostra à temperatura ambiente e outra a 5°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) [24,25].

Caso não se verifique estabilidade de uma solução analítica no período definido (normalmente 24 horas), em condições de conservação pré-estabelecidas, deverá proceder-se ao mesmo estudo reduzindo o período de conservação [24,25].

Robustez

A robustez de um método analítico indica a sua capacidade de permanecer inalterado perante a introdução deliberada de pequenas variações nas suas condições (por exemplo condições cromatográficas), dando informação sobre a sua fiabilidade durante a sua utilização normal [24-26].

Os fatores que podem afetar o comportamento cromatográfico incluem a composição da fase móvel, a força iónica, a temperatura, o pH da fase móvel, o caudal, o comprimento da coluna, a pressão e as características da fase estacionária da coluna [24-26].

A robustez de um método deve ser avaliada durante o desenvolvimento do mesmo. Assim sendo, em caso de serem utilizados métodos descritos nas farmacopeias pode não ser necessário avaliar este parâmetro. Em caso de se verificar que a resposta analítica é suscetível de variações mediante alterações às condições, estas devem ser controladas e descritas no procedimento de trabalho qual a gama máxima de variação permitida [24-26].

Podem ainda ser estabelecidos testes de **adequabilidade do sistema** de forma a assegurar a validade do método analítico quando este é utilizado [24-26].

Adequabilidade do sistema

Os testes de adequabilidade do sistema são estabelecidos de modo a garantir que o método analítico e o equipamento apresentam o desempenho esperado, em termos de resolução e reprodutibilidade, no início, durante e no final da análise das amostras [24,25].

Estes podem incluir a determinação da eficiência da coluna (determinação do número de pratos teóricos), a resolução, o fator de simetria e a precisão de injeções múltiplas de uma solução padrão com concentração de trabalho [24,25].

2.6. Desenho experimental

Desenho experimental é um método estatístico organizado e controlado de analisar experiências com a finalidade de maximizar a quantidade de informação obtida de um grupo de resultados experimentais. O principal objetivo do desenho experimental é estimar a influência de um conjunto de variáveis de entrada (fatores) sobre um conjunto de variáveis de saída (respostas) [27-29].

De modo a encontrar a influência dos fatores sobre as respostas, fazem-se variar todos os fatores em simultâneo num determinado número de experiências previamente planeadas. Depois, as respostas são retiradas e interpretadas de modo a identificar os fatores críticos de entrada. Para além de calcular o efeito dos fatores sobre as respostas, o desenho de experiências permite também identificar interações entre fatores de modo a otimizar os produtos/processos em estudo [27-29].

Ao criar um desenho de experiências, é necessário respeitar os seus princípios fundamentais: aleatoriedade, replicação e *blocking* [28].

A aleatoriedade na ordem das experiências é utilizada para garantir a existência de dados independentes, evitando a presença de qualquer tendência que induza em falsas conclusões [28].

A replicação permite a avaliação do erro experimental através da análise de múltiplas experiências que se sabe serem idênticas [28].

Blocking refere-se às experiências serem organizadas em bloco de modo a minimizar a variância experimental. Isto permite detetar a presença de fatores conhecidos, mas não controlados, como por exemplo a variabilidade entre lotes, aumentando a precisão do desenho de experiências removendo fatores de ruído não controlados [28].

No Apêndice A, encontram-se exemplos de aplicações estatísticas, através de desenho experiências, utilizadas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Das várias aplicações em que o desenho de experiências pode ser aplicado a nível industrial, evidenciam-se as seguintes [27,28]:

- Desenvolvimento de novos produtos;
- Otimização da qualidade de um produto;
- Otimização de processos de fabrico;
- Triagem e identificação de fatores críticos;
- Testes de robustez de produtos e processos.

Deste modo, é possível identificar as três principais aplicações de um desenho de experiências:

- 1) **Análise exploratória:** Tem como objetivo estudar a influência de vários fatores sobre as respostas desejadas e identificar as suas gamas ótimas de utilização. Normalmente são efetuadas poucas experiências com um grande número de fatores de modo a definir quais os fatores críticos e a região experimental a utilizar na fase seguinte (otimização) [27];
- 2) **Otimização:** Tem como objetivo prever as respostas para todas as combinações de fatores possíveis na região experimental utilizada e identificar a combinação de fatores que resultará em condições ideais de produto/processo. Exige mais experiências por fator para revelar a importância de cada fator e como se relaciona com a resposta [27];
- 3) **Teste de robustez:** O teste de robustez é, normalmente, o último teste a ser aplicado antes de um produto/processo ser aprovado. O seu objetivo é determinar a sensibilidade do desenho experimental quando são impostas, deliberadamente, pequenas alterações nos níveis dos fatores [27].

Em seguida, são apresentados os tipos de desenho experimental utilizados mais frequentemente na análise exploratória e na otimização de produtos/processos farmacêuticos e por extensão na otimização de suplementos alimentares:

- **Desenho fatorial completo:** é um desenho de experiências onde todos os níveis (X) de cada fator (k) são combinados com todos os níveis de todos os outros fatores. O número total de experiências é, deste modo, X^k , ver Figura 2.2. Devido ao elevado número de

experiências por fator, é normalmente utilizado apenas quando o número de fatores é reduzido [30,31].

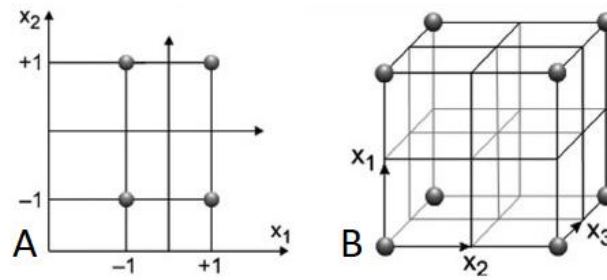


Figura 2.2 - Desenho fatorial completo: A) 2^2 ; B) 2^3

- **Desenho fatorial fracionado:** No caso de haver um grande número de fatores, pode recorrer-se a um desenho fatorial fracionado. Este desenho corresponde a uma fração finita ($1/X^r$) de um desenho fatorial completo, onde r é o grau de fracionamento e X^{k-r} é o número total de experiências necessárias, ver Figura 2.3 [30].

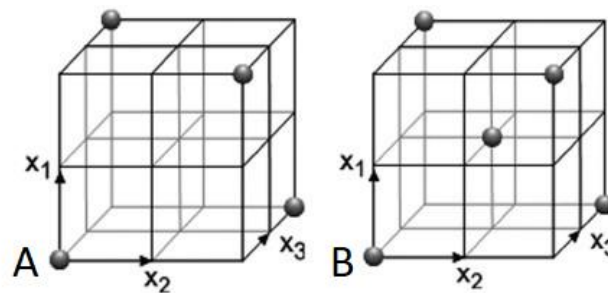


Figura 2.3 - Desenho fatorial fracionado: A) $2^{(3-1)}$; B) $2^{(3-1)}$ com ponto central adicionado

No entanto, ao transformar um desenho fatorial completo num fracionado, deixa de ser possível calcular o efeito independente de cada fator, confundindo-se eventualmente os efeitos principais com as interações entre fatores e as diferentes interações entre si consoante o grau de resolução escolhido. O grau de resolução dita o estado de confusão dos efeitos [27]:

- Grau de resolução III** – confusão entre os efeitos principais e as interações entre dois fatores;
 - Grau de resolução IV** – confusão entre as interações de dois fatores;
 - Grau de resolução $\geq V$** – sem confusão entre os efeitos principais e as interações de dois fatores e das interações entre si.
- **Desenho de Plackett-Burman:** este é um desenho fatorial fracionado de dois níveis e $(N-1)$ fatores, onde N é múltiplo de 4, utilizado normalmente em análise exploratória [30].
 - **Desenho composto central:** Este é o mais utilizado para respostas não-lineares que requerem modelos de segunda ordem. O desenho composto central contém um desenho fatorial completo (2^k) ou fracionado (2^{k-1}) aumentado por um grupo de pontos estrela ($2k$) e um conjunto de ponto central replicado m vezes, ver Figura 2.4. O número total de combinações num desenho composto central é dado por 2^k ou $2^{k-1} + 2k + m$. Uma variação

bastante utilizada deste desenho é o desenho composto central centrado nas faces (CCF), no qual os pontos estrela estão centrados nas faces, requerendo 3 níveis para cada fator [30-32].

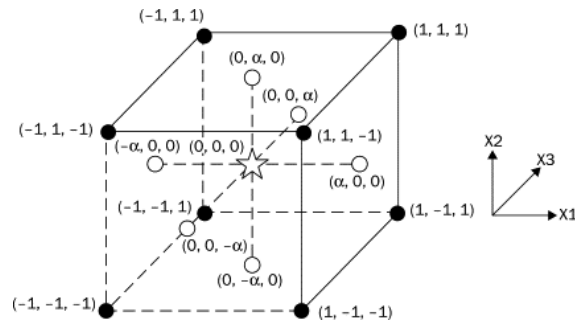


Figura 2.4 - Desenho composto central, centrado nas faces quando $\alpha = 1$

- **Desenho *optimal*:** Desenho gerado por algoritmo através de *softwares* estatísticos, útil para domínios de forma irregular [30].
- **Desenho Box-Behnken:** O desenho Box-Behnken requer três níveis (3^k) para cada fator e é uma alternativa económica ao desenho composto central, ver Figura 2.5 [30].

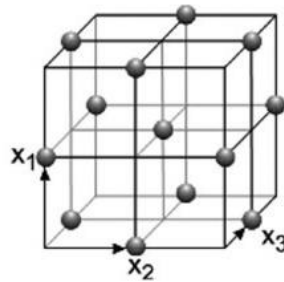


Figura 2.5 - Desenho Box-Behnken com três fatores

- **Desenho de mistura:** É utilizado quando o produto apresenta vários componentes e as características do produto dependem essencialmente das proporções entre componentes, ver Figura 2.6 [30].

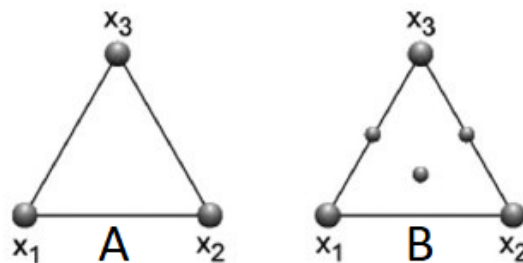


Figura 2.6 - Desenho de mistura: A) Linear; B) Quadrático

Modelação matemática em desenho experimental

A relação entre fatores e respostas é possível através da aplicação de modelos de regressão a um conjunto de dados obtidos num desenho experimental. Os modelos de regressão são modelos empíricos utilizados para expressar resultados de uma experiência quantitativa de modo a facilitar a sua compreensão e interpretação [29,33].

Existem diferentes tipos de modelos de regressão sendo que os mais utilizados em análise exploratória são os modelos de regressão linear [29,33]:

1) Modelação por regressão linear múltipla

Nos modelos de regressão linear múltipla (RLM ou MLR) a resposta é estimada a partir dos fatores, assumindo que existe uma relação linear entre eles. Esta relação entre fatores e resposta é estimada, normalmente, através da seguinte equação [29,33]:

$$Y = X * \beta + \varepsilon$$

Onde Y, X, β e ε representam, respetivamente, o vetor das variáveis resposta, o vetor de fatores de entrada, os coeficientes de regressão e o erro experimental associado.

Os coeficientes de regressão (β_i) representam a variação prevista na resposta em função da variação nos fatores de entrada (x_i) quando todos os restantes fatores são mantidos constantes [33].

2) Modelação por mínimos quadrados parciais

Regressão por mínimos quadrados parciais (MQP ou PLS) é um método de regressão multivariado onde é possível trabalhar com várias respostas em simultâneo, tendo em conta as suas covariâncias. Este modelo permite então obter uma visão geral de como todos os fatores influenciam todas as respostas [27,29,33].

A modelação por mínimos quadrados parciais relaciona a matriz X (fatores de entrada) com a matriz Y (variáveis de resposta) através da projeção de ambas as matrizes para um espaço hiperdimensional com o objetivo de aproximar os espaços ocupados pelas matrizes X e Y e também de maximizar a correlação das duas matrizes [27,29].

A relação entre os vetores X e Y é feita do mesmo modo que na modelação por regressão linear múltipla (MLR), sendo as suas expressões polinomiais idênticas [27].

Parâmetros de ajuste do modelo

Após se efetuar o ajuste de um modelo aos dados fornecidos de acordo com o desenho experimental escolhido, é necessário avaliar o modelo MLR ou PLS obtido.

Os modelos MLR e PLS são caracterizados pelos seguintes parâmetros de ajuste do modelo:

- **Coefficiente de correlação (R^2):** medida de qualidade do ajuste do modelo que representa o grau de semelhança entre os valores observados e os previstos pelo modelo. Este

coeficiente estima a qualidade do modelo e varia entre 0 e 1, sendo que valores próximos de 1 indicam que o modelo se ajusta adequadamente aos dados [27,29];

- **Coeficiente de previsão (Q^2):** mede a capacidade de previsão do modelo, isto é, a sua capacidade de gerar dados não vistos. Varia de menos infinito até 1, sendo que um valor de Q^2 superior a 0,1 indica um modelo com uma significativa capacidade de previsão e um Q^2 superior a 0,5 indica uma boa capacidade de previsão do modelo. Este valor não deve diferir em mais de 0,3 do R^2 [27,29];
- **Validade do modelo:** indica se o modelo foi bem ajustado e relaciona o erro de ajuste do modelo com o erro puro. Um valor de validade do modelo superior a 0,25 indica que o modelo está bem ajustado e que o erro do modelo não é significativamente superior ao erro puro. Um valor baixo, inferior a 0,25, pode indicar que o modelo não está bem ajustado, sendo que quando o erro puro é muito pequeno (réplicas quase idênticas, valor de reprodutibilidade muito próximo de 1) a validade do modelo pode ser baixa mesmo que o modelo seja bom e completo. Quando o erro puro é praticamente inexistente, a validade do modelo é classificada como ausente, não podendo ser calculada [29].
- **Reprodutibilidade:** indica a variação da resposta com a entrada múltipla dos mesmos fatores em níveis iguais, normalmente realizada no ponto central. O valor de reprodutibilidade deve ser superior a 0,5 [29].

Reajuste do modelo

O reajuste do modelo é feito de modo a torná-lo mais adequado aos dados obtidos e consiste em duas etapas [27]:

- 1) **Remoção de *outliers*:** remoção de experiências pontuais às quais o modelo não se consegue adaptar. Nos gráficos de resíduos e de valores observados *versus* previstos é possível identificar a presença de *outliers* como sendo os pontos que se encontram fora da zona prevista em ± 4 desvios padrão. A remoção destes pontos permitirá a melhoria dos parâmetros de ajuste do modelo, contudo, o tratamento dos *outliers* deve ser levado de forma ponderada, pois a eliminação automática e espontânea de todos os *outliers* identificados inicialmente poderá levar a um modelo falacioso [27,29].
- 2) **Remoção de coeficientes não significativos:** um termo é considerado não significativo quando o seu intervalo de confiança inclui o zero, podendo ser eliminado.

Interpretação do modelo

A interpretação do modelo é essencial para entender quais os fatores que são significativos na variação de respostas [27,29].

Assim, é necessário avaliar o gráfico dos coeficientes, que indica quais os coeficientes e interações significativos e não significativos presentes no modelo. Os efeitos reais são estimados pelos coeficientes e o ruído está contido nos intervalos de confiança, sendo a incerteza dos coeficientes dada pelo intervalo de confiança e pelo tamanho do ruído [27,29].

Os coeficientes que sejam muito inferiores ao seu intervalo de confiança são considerados não significativos e podem, portanto, ser eliminados dos modelos [27,29].

Por último, deve-se fazer a análise de variância. Para isto procede-se ao teste de significância da regressão linear, que é satisfatório quando o valor da probabilidade (p) é inferior a 0,05 e ao teste de lack-of-fit, que compara o erro do modelo com o erro dos replicados e satisfaz quando o seu valor de probabilidade (p) é superior a 0,05 [27,29].

Com isto, a implementação do desenho experimental pode ser resumida nas seguintes fases [27-29]:

- 1) Definição dos fatores;
- 2) Definição das respostas;
- 3) Definição do objetivo experimental - análise exploratória, otimização ou teste de robustez;
- 4) Realização das experiências e recolha dos resultados das variáveis de resposta;
- 5) Modelação dos dados e avaliação do modelo;
- 6) Interpretação do modelo.

Parte B – Reformulação de um suplemento alimentar

3. Materiais e métodos

De seguida, apresentam-se os equipamentos (Tabela 3.1), os reagentes (Tabela 3.2) e as matérias-primas (Tabela 3.3) utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.

Equipamento

Tabela 3.1 - Equipamentos utilizados na parte B

| Equipamento | Marca | Modelo |
|---------------------------------|---------------------|-----------------|
| Balança | Mettler Toledo | MS105DU |
| Balança | Mettler Toledo | AG204 |
| Ultrassons | Bandelin | Sonorex Digitec |
| Placa de aquecimento e agitação | IKA | RET basic |
| Eléctrodo de pH | Metrohm | 744 Meter |
| Sistema cromatográfico: | | |
| Bomba quaternária | Agilent 1100 Series | G1311A |
| Detector | Agilent 1100 Series | G1314A |
| “Auto-sampler” | Agilent 1100 Series | G1329A |
| Termóstato do “auto-sampler” | Agilent 1100 Series | G1330B |
| Computador | Dell | OptiPlex 320 |
| Processador de dados | ChemStation | B.04.02 [96] |

Material

Tabela 3.2 - Reagentes utilizados na parte B

| Materiais | Fornecedor |
|---|--------------------------|
| Água purificada | HPLC Milli-Q System |
| Metanol (grau de pureza para HPLC) | Honeywell/Riedel-de-Häen |
| Acetonitrilo (grau de pureza para HPLC) | Honeywell/Riedel-de-Häen |
| Butil-hidroxitolueno | Merck |
| N-pentano | ChemLab |
| N-hexano | VWR |

Matérias-primas

Tabela 3.3 - Matérias-primas utilizadas na otimização da formulação do suplemento alimentar em estudo

| | Composto | Quantidade por frasco (mg/200mL) | | |
|----------------|---|----------------------------------|-------|-------|
| Vitaminas | Vitamina A (sob a forma de palmitato) | Constante | | |
| | Vitamina D ₂ (Calciferol) | Constante | | |
| | Vitamina E (Sob a forma de Acetato DL- α -tocoferol) | 80,0 | 100,0 | 120,0 |
| | Cálcio (sob a forma de cloreto) | 0,0 | 422,5 | 845,0 |
| Oligoelementos | Ferro (sob a forma de sulfato) | Constante | | |
| | Cobre (sob a forma de sulfato) | Constante | | |
| | Molibdênio (sob a forma de molibdato de sódio) | Constante | | |
| | Potássio (sob a forma de glicerofosfato) | Constante | | |
| | Manganésio (sob a forma de glicerofosfato) | Constante | | |
| | | | | |
| Excipientes | Açúcar | Constante | | |
| | Sacarina Sódica | Constante | | |
| | Glicerina | Constante | | |
| | Sorbato de potássio | Constante | | |
| | Tween 80 | Constante | | |
| | Ácido Cítrico | Constante | | |
| | Citrato de sódio | Constante | | |
| | Butil-hidroxitolueno (BHT) | 0,0 | 10,0 | 20,0 |
| | Álcool 96% | Constante | | |
| | Água purificada | Constante | | |

Métodos

- Produção de várias amostras de 200mL com a composição original do produto em estudo, alterando o oligoelemento presente em cada fórmula. Cada fórmula foi armazenada durante um mês de modo a observar a possível formação de precipitado em cada uma;
- Produção de várias amostras de 200mL com a composição indicada na tabela 3.3, alterando as quantidades dos fatores em estudo (BHT, vit.E e sal de cálcio) segundo o desenho experimental apresentado na tabela 4.2. Cada fórmula foi armazenada durante 3 meses em dois tipos de condições de conservação: 25°C e 60%HR; 40°C e 75%HR, para análise em 0 dias, 1 mês e 3 meses;
- Método cromatográfico de alta resolução (isocrático) com detetor ultravioleta - para identificação e quantificação do teor de analitos alvo nas soluções orais preparadas no tempo zero, ao fim de 1 mês e de 3 meses, utilizando as condições cromatográficas apresentadas na Tabela 3.4;
- pH - método baseado na Farmacopeia Europeia (capítulo 2.2.3 “Potentiometric determination of pH”) para determinação do pH das soluções orais preparadas no tempo zero e após 3 meses;

- Filtração das soluções orais através de cadinhos filtrantes (com o auxílio de sistema de vácuo), para posterior determinação da massa do resíduo correspondente à quantificação do precipitado do sal de cálcio.

Tabela 3.4 - Condições cromatográficas utilizadas na validação dos métodos analíticos de doseamento das vitaminas A e E

| Condições cromatográficas | Método analítico de doseamento | |
|---|--|--|
| | Vitamina A | Vitamina E |
| Coluna (enchimento, dimensões) | Partisil C8 - 5µm, 250 x 4.6 mm | Partisil C8 - 5µm, 250 x 4.6 mm |
| Fluxo (mL/min) | 1 | 1 |
| Temperatura da coluna (°C) | Ambiente | Ambiente |
| Temperatura do <i>auto-sampler</i> (°C) | 5 | Ambiente |
| Volume de injeção (µL) | 20 | 50 |
| Comprimento de onda (nm) | 325 | 284 |
| Tempo de corrida (minutos) | 15 | 15 |
| Fase móvel* | Mistura de solvente orgânico #1 e solvente orgânico #2 | Mistura de solvente orgânico #1 e solvente orgânico #2 |

*A composição da fase móvel não será descrita em função da sua confidencialidade.

Software

Utilizou-se o programa MODDE 12.1 da UMETRICS AB como *software* de desenho experimental.

4. Tratamento dos Resultados

4.1. Testes de Solubilidade

Para dar início ao trabalho, foram concebidas sete formulações diferentes – fórmulas A a G – onde se fez variar os oligoelementos presentes em cada fórmula. Estas formulações iniciais não tinham presentes as vitaminas nem agentes solubilizantes das vitaminas lipossolúveis, mas apresentavam todos os restantes excipientes do suplemento alimentar proposto.

A fórmula A continha todos os oligoelementos presentes na constituição do suplemento original, enquanto que nas fórmulas seguintes apenas um dos oligoelementos permanecia presente na solução, tendo assim uma fórmula com todos os seis oligoelementos e seis fórmulas com um oligoelemento diferente cada uma. Estas fórmulas foram armazenadas a temperatura ambiente e ao final de um mês verificou-se a sua limpidez (nomeadamente, o aparecimento ou não de precipitado).

No tempo zero, foi possível inferir que o oligoelemento utilizado na fórmula B é o que confere a tonalidade amarela à solução, por esta ser a única fórmula a apresentar cor amarela das seis – B a G - que possuíam apenas um oligoelemento.

Destas fórmulas apenas duas precipitaram, sendo uma delas a fórmula com todos os oligoelementos e a segunda a fórmula G. Assim, foi possível evidenciar que o sal que estava a provocar precipitação na solução oral seria o sal utilizado na fórmula G, glicerofosfato de cálcio. Com isto, procedeu-se a um estudo comparativo das propriedades químicas e físicas de vários sais deste oligoelemento (cálcio).

Tendo em conta que a solubilidade do cloreto de cálcio é superior à do cálcio sob a forma de glicerofosfato, foram preparadas 5 novas fórmulas (fórmula H a L) equivalentes à fórmula A, onde as primeiras duas fórmulas – H e I – continham glicerofosfato de cálcio na quantidade máxima (1600mg/200ml) e intermédia (800mg/200ml), respetivamente. As seguintes fórmulas – J e K – foram preparadas com cloreto de cálcio, sal a ser testado, também nas quantidades máxima (845mg/200ml) e intermédia (422,5mg/200ml) e a fórmula L sem sal de cálcio.

As amostras foram armazenadas a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ protegidas da luz e ao fim de um mês concluiu-se que nenhuma destas obtinha precipitado, portanto, as amostras H a L foram novamente preparadas – fórmulas H2 a L2 – porém armazenadas a temperatura ambiente. Após um mês foi possível verificar formação de precipitado apenas na fórmula H2, concluindo-se que o sal original de cálcio utilizado precipitava apenas na sua quantidade máxima.

Assim, deu-se continuidade ao trabalho substituindo o glicerofosfato de cálcio, utilizado na fórmula original, pelo cloreto de cálcio por este não apresentar problemas de estabilidade física (formação de precipitado) nas soluções testadas.

Os resultados descritos anteriormente estão evidenciados na Tabela 4.1 e Figura 4.1.

Tabela 4.1 - Resumo dos testes de solubilidade

| Temperatura de armazenamento | Fórmula | Oligoelementos utilizados | Cor em t=0dias | Formação de precipitado t=1mês |
|------------------------------|-----------|--|----------------|--------------------------------|
| Ambiente (25°C ± 3°C) | A | 6 Oligoelementos | Amarelada | Sim |
| | B | O1* | Amarelada | Não |
| | C | O2* | Incolor | Não |
| | D | O3* | Incolor | Não |
| | E | O4* | Incolor | Não |
| | F | O5* | Incolor | Não |
| | G | Cálcio (na forma de glicerofosfato) – Nível máximo | Incolor | Sim |
| 5°C ± 3°C | H | Cálcio (na forma de glicerofosfato) – Nível máximo | Amarelada | Não |
| | I | Cálcio (na forma de glicerofosfato) – Nível intermédio | Amarelada | Não |
| | J | Cálcio (na forma de cloreto) – Nível máximo | Amarelada | Não |
| | K | Cálcio (na forma de cloreto) – Nível intermédio | Amarelada | Não |
| | L | Sal de cálcio ausente | Amarelada | Não |
| Ambiente (25°C ± 3°C) | H2 | Cálcio (na forma de glicerofosfato) – Nível máximo | Amarelada | Sim |
| | I2 | Cálcio (na forma de glicerofosfato) – Nível intermédio | Amarelada | Não |
| | J2 | Cálcio (na forma de cloreto) – Nível máximo | Amarelada | Não |
| | K2 | Cálcio (na forma de cloreto) – Nível intermédio | Amarelada | Não |
| | L2 | Sal de cálcio ausente | Amarelada | Não |

*Ox – Oligoelemento x

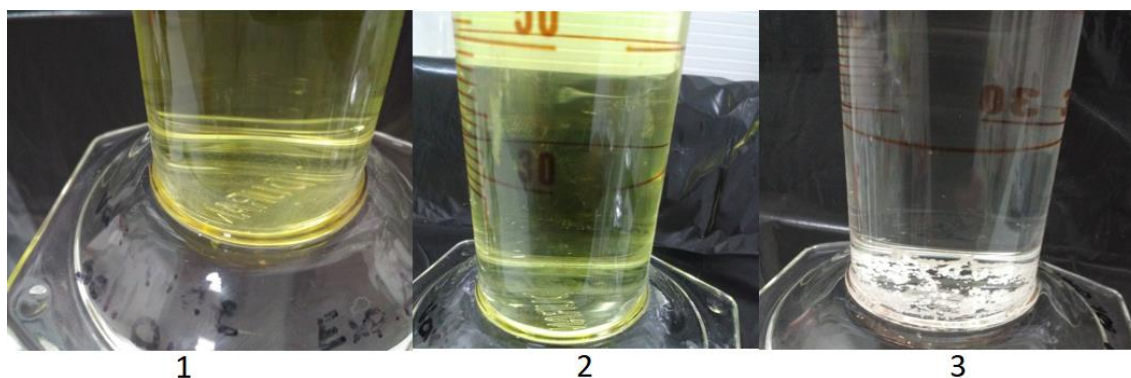


Figura 4.1 - Resultados dos testes de solubilidade após um mês: 1) fórmula A; 2) fórmula B; 3) fórmula G

4.2. Aplicação do desenho experimental na otimização da formulação

4.2.1. Definição de variáveis e do desenho experimental

a) Fatores

Com base na revisão bibliográfica efetuada sobre as propriedades dos excipientes e componentes ativos presentes na solução oral, destacou-se três componentes como parâmetros críticos da formulação: o cloreto de cálcio, o BHT e a vitamina E (acetato de α -tocoferol).

A quantidade de cloreto de cálcio é crítica para a estabilidade física da formulação pois, depois dos testes de solubilidade executados, foi o único sal que originou a formação de precipitado na solução, ao fim de um mês de conservação à temperatura ambiente. De igual forma, a sua concentração poderá afetar o pH da solução, segundo testes preliminares e, consequentemente, a eficácia do conservante devido à saída do intervalo de pH ótimo de atuação do agente antimicrobiano presente na fórmula: sorbato de potássio (4 - 4,5).

O conteúdo de BHT e vitamina E tornam-se essenciais por atuarem como antioxidantes, estabilizando a Vitamina A, componente ativo fundamental e de fácil degradação na formulação.

A gama de variação destes componentes foi selecionada de acordo com os quantidades utilizadas por Volker Bühler [34], em formulações idênticas à formulação em estudo, e de acordo com o *Handbook of Excipients* [20], ver Tabela 4.2.

b) Respostas

Os principais objetivos deste trabalho são manter a estabilidade física e química da solução oral multivitamínica, como tal, selecionaram-se as seguintes respostas, por serem variáveis importantes na avaliação da qualidade do suplemento alimentar:

- Variação do teor de vitamina – a variação do teor de vitamina A afeta a eficácia do suplemento alimentar e adicionalmente pode influenciar o aspeto e palato da solução, devido à sua oxidação. Esta variação não deve ser superior a 50% ao fim de 6 meses, de modo a cumprir os limites de especificação mínimos (90% em relação ao rotulado) de quantidade de vitamina A presente na fórmula, tendo em conta a sua sobrecarga inicial (140%);
- Formação de precipitado – a formação de precipitado na solução oral multivitamínica é um fator eliminatório na avaliação da qualidade/estabilidade do suplemento alimentar;
- Variação de pH – a variação do pH pode afetar a função do agente antimicrobiano presente na solução oral multivitamínica e, consequentemente, afetar a eficácia do sistema conservante.

c) Desenho experimental

Com base nos tipos de desenho experimental propostos pelo *software* MODDE (fatorial completo, fatorial fracionado, Box-Behnken, etc) e pela revisão bibliográfica relativa a recentes aplicações de desenho experimental em desenvolvimento farmacêutico [37-39], optou-se por

aplicar um desenho composto central centrados nas faces (CCF) de modo a estudar três níveis em cada um dos três fatores por este devolver um número de experiências necessárias inferior relativamente aos outros.

Este desenho contempla 8 experiências que provenientes do desenho fatorial 2^k , 6 experiências (2k) representativas do centro de cada face do espaço fatorial e ainda 3 réplicas do ponto central, dando então um total de 17 experiências, resumidas na Tabela 4.2, onde as concentrações de cloreto de cálcio, BHT e vitamina E se alteram de acordo com o indicado e os restantes componentes do suplemento alimentar multivitamínico permaneciam constantes.

Tabela 4.2 – Desenho experimental proposto para avaliação da formulação

| Lote | Cloreto de Cálcio (mg/200mL) | BHT (mg/200mL) | Vitamina E (mg/200mL) |
|-------------|---|---------------------------|----------------------------------|
| DG19006 | 0,0 | 0,0 | 80,0 |
| DG19007 | 845,0 | 0,0 | 80,0 |
| DG19008 | 0,0 | 20,0 | 80,0 |
| DG19009 | 845,0 | 20,0 | 80,0 |
| DG19010 | 0,0 | 0,0 | 120,0 |
| DG19011 | 845,0 | 0,0 | 120,0 |
| DG19012 | 0,0 | 20,0 | 120,0 |
| DG19013 | 845,0 | 20,0 | 120,0 |
| DG19014 | 0,0 | 10,0 | 100,0 |
| DG19015 | 845,0 | 10,0 | 100,0 |
| DG19016 | 422,5 | 0,0 | 100,0 |
| DG19017 | 422,5 | 20,0 | 100,0 |
| DG19018 | 422,5 | 10,0 | 80,0 |
| DG19019 | 422,5 | 10,0 | 120,0 |
| DG19020* | 422,5 | 10,0 | 100,0 |
| DG19021* | 422,5 | 10,0 | 100,0 |
| DG19022* | 422,5 | 10,0 | 100,0 |

*Réplicas do ponto central.

4.2.2. Resultados do desenho de experiências

Cada uma das 17 experiências foi feita em duplicado, de modo a ser possível armazenar uma amostra de cada experiência a 25°C e 60% HR e a segunda amostra a 40°C e 75% HR (condições de estabilidade acelerada).

Depois de efetuadas as 17 experiências indicadas na Tabela 4.2, as três respostas selecionadas foram analisadas no tempo zero (t0), correspondente ao tempo em que se preparou cada amostra, ao fim de um mês (t1) e ao fim de 3 meses (t2).

Os resultados correspondentes à variação do teor de vitamina A são apresentados na Tabela 4.3 e na Tabela 4.4, os resultados respetivos ao valor de pH são apresentados na Tabela 4.5 e na Tabela 4.6 e os resultados respetivos à quantidade de precipitado ao longo do tempo são apresentados na Tabela 4.7 e na Tabela 4.8.

Tabela 4.3 - Variação do teor de vitamina A a 25°C 60%HR

| Δ (%VITAMINA A) 25°C 60%HR | | | | | |
|-----------------------------------|---|---------------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|
| LOTE | Cloreto de Cálcio (mg/200mL) | BHT (mg/200mL) | Vitamina E (mg/200mL) | t1 (%) | t2 (%) |
| DG19006 | 0,0 | 0,0 | 80,0 | 9,7 | -4,1 |
| DG19007 | 845,0 | 0,0 | 80,0 | 13,8 | -4,4 |
| DG19008 | 0,0 | 20,0 | 80,0 | 12,0 | 3,2 |
| DG19009 | 845,0 | 20,0 | 80,0 | 5,0 | -1,0 |
| DG19010 | 0,0 | 0,0 | 120,0 | 6,4 | -1,2 |
| DG19011 | 845,0 | 0,0 | 120,0 | 1,0 | -5,6 |
| DG19012 | 0,0 | 20,0 | 120,0 | 13,2 | 5,0 |
| DG19013 | 845,0 | 20,0 | 120,0 | 11,2 | 6,1 |
| DG19014 | 0,0 | 10,0 | 100,0 | 0,4 | -9,6 |
| DG19015 | 845,0 | 10,0 | 100,0 | 0,2 | -7,3 |
| DG19016 | 422,5 | 0,0 | 100,0 | -7,5 | -11,5 |
| DG19017 | 422,5 | 20,0 | 100,0 | -10,0 | -12,7 |
| DG19018 | 422,5 | 10,0 | 80,0 | -3,7 | -9,7 |
| DG19019 | 422,5 | 10,0 | 120,0 | -5,7 | -10,6 |
| DG19020 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | -9,2 | -11,7 |
| DG19021 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | -9,5 | -10,8 |
| DG19022 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | -5,4 | -12,0 |

t1 – 1 mês; t2 – 3 meses.

Tabela 4.4 - Variação do teor de vitamina A a 40°C 75%HR

| Δ (%VITAMINA A) 40°C 75%HR | | | | | |
|-----------------------------------|---|---------------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|
| LOTE | Cloreto de Cálcio (mg/200mL) | BHT (mg/200mL) | Vitamina E (mg/200mL) | t1 (%) | t2 (%) |
| DG19006 | 0,0 | 0,0 | 80,0 | 1,0 | -31,6 |
| DG19007 | 845,0 | 0,0 | 80,0 | 4,1 | -32,1 |
| DG19008 | 0,0 | 20,0 | 80,0 | 0,7 | -23,7 |
| DG19009 | 845,0 | 20,0 | 80,0 | -4,8 | -28,9 |
| DG19010 | 0,0 | 0,0 | 120,0 | -4,8 | -30,1 |
| DG19011 | 845,0 | 0,0 | 120,0 | -8,2 | -32,9 |
| DG19012 | 0,0 | 20,0 | 120,0 | 3,5 | -18,4 |
| DG19013 | 845,0 | 20,0 | 120,0 | 2,8 | -19,9 |
| DG19014 | 0,0 | 10,0 | 100,0 | -8,6 | -35,2 |
| DG19015 | 845,0 | 10,0 | 100,0 | -8,8 | -32,6 |
| DG19016 | 422,5 | 0,0 | 100,0 | -17,3 | -38,3 |
| DG19017 | 422,5 | 20,0 | 100,0 | -23,0 | -41,5 |
| DG19018 | 422,5 | 10,0 | 80,0 | -10,9 | -35,0 |
| DG19019 | 422,5 | 10,0 | 120,0 | -13,9 | -33,7 |
| DG19020 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | -17,6 | -37,5 |
| DG19021 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | -20,5 | -40,4 |
| DG19022 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | -14,5 | -39,7 |

t1 – 1 mês; t2 – 3 meses.

Tabela 4.5 - Valor de pH a 25°C 60%HR

| VALOR DE PH 25°C 60%HR | | | | | | |
|------------------------|---------------------------------|-------------------|--------------------------|------|------|------|
| LOTE | Cloreto de Cálcio (mg/200mL) | BHT (mg/200mL) | Vitamina E (mg/200mL) | t0 | t1 | t2 |
| DG19006 | 0,0 | 0,0 | 80,0 | 4,15 | 4,12 | 4,17 |
| DG19007 | 845,0 | 0,0 | 80,0 | 3,82 | 3,76 | 3,70 |
| DG19008 | 0,0 | 20,0 | 80,0 | 4,19 | 4,19 | 4,20 |
| DG19009 | 845,0 | 20,0 | 80,0 | 3,83 | 3,81 | 3,74 |
| DG19010 | 0,0 | 0,0 | 120,0 | 4,21 | 4,19 | 4,18 |
| DG19011 | 845,0 | 0,0 | 120,0 | 3,85 | 3,80 | 3,72 |
| DG19012 | 0,0 | 20,0 | 120,0 | 4,15 | 4,19 | 4,18 |
| DG19013 | 845,0 | 20,0 | 120,0 | 3,82 | 3,79 | 3,74 |
| DG19014 | 0,0 | 10,0 | 100,0 | 4,21 | 4,16 | 4,21 |
| DG19015 | 845,0 | 10,0 | 100,0 | 3,84 | 3,78 | 3,72 |
| DG19016 | 422,5 | 0,0 | 100,0 | 3,93 | 3,97 | 3,97 |
| DG19017 | 422,5 | 20,0 | 100,0 | 3,96 | 3,95 | 3,94 |
| DG19018 | 422,5 | 10,0 | 80,0 | 3,94 | 3,96 | 3,96 |
| DG19019 | 422,5 | 10,0 | 120,0 | 3,97 | 3,96 | 3,98 |
| DG19020 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | 3,97 | 3,98 | 3,98 |
| DG19021 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | 3,97 | 3,96 | 3,96 |
| DG19022 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | 3,95 | 3,97 | 3,99 |

t0 – 0 dias; t1 – 1 mês; t2 – 3 meses.

Tabela 4.6 - Valor de pH a 40°C 75%HR

| VALOR DE PH 40°C 75%HR | | | | | | |
|------------------------|---------------------------------|-------------------|--------------------------|------|------|------|
| LOTE | Cloreto de Cálcio (mg/200mL) | BHT (mg/200mL) | Vitamina E (mg/200mL) | t0 | t1 | t2 |
| DG19006 | 0,0 | 0,0 | 80,0 | 4,15 | 4,14 | 4,18 |
| DG19007 | 845,0 | 0,0 | 80,0 | 3,82 | 3,71 | 3,73 |
| DG19008 | 0,0 | 20,0 | 80,0 | 4,19 | 4,20 | 4,20 |
| DG19009 | 845,0 | 20,0 | 80,0 | 3,83 | 3,75 | 3,74 |
| DG19010 | 0,0 | 0,0 | 120,0 | 4,21 | 4,20 | 4,18 |
| DG19011 | 845,0 | 0,0 | 120,0 | 3,85 | 3,75 | 3,61 |
| DG19012 | 0,0 | 20,0 | 120,0 | 4,15 | 4,21 | 4,19 |
| DG19013 | 845,0 | 20,0 | 120,0 | 3,82 | 3,75 | 3,74 |
| DG19014 | 0,0 | 10,0 | 100,0 | 4,21 | 4,18 | 4,22 |
| DG19015 | 845,0 | 10,0 | 100,0 | 3,84 | 3,74 | 3,72 |
| DG19016 | 422,5 | 0,0 | 100,0 | 3,93 | 4,00 | 3,97 |
| DG19017 | 422,5 | 20,0 | 100,0 | 3,96 | 3,98 | 3,97 |
| DG19018 | 422,5 | 10,0 | 80,0 | 3,94 | 3,98 | 3,97 |
| DG19019 | 422,5 | 10,0 | 120,0 | 3,97 | 3,98 | 3,97 |
| DG19020 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | 3,97 | 3,99 | 3,98 |
| DG19021 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | 3,97 | 3,99 | 3,97 |
| DG19022 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | 3,95 | 4,01 | 3,99 |

t0 – 0 dias; t1 – 1 mês; t2 – 3 meses.

Tabela 4.7 - Quantidade de precipitado a 25°C 60%HR

| FORMAÇÃO DE PRECIPITADO 25°C 60%HR | | | | | | |
|---|---|---------------------------|----------------------------------|-----------|------------|------------------------|
| LOTE | Cloreto de Cálcio (mg/200mL) | BHT (mg/200mL) | Vitamina E (mg/200mL) | t0 | t1 | t2 (gramas) |
| DG19006 | 0,0 | 0,0 | 80,0 | Não | Não | 0 |
| DG19007 | 845,0 | 0,0 | 80,0 | Não | Sim | 0,576 |
| DG19008 | 0,0 | 20,0 | 80,0 | Não | Não | 0 |
| DG19009 | 845,0 | 20,0 | 80,0 | Não | Sim | 0,558 |
| DG19010 | 0,0 | 0,0 | 120,0 | Não | Não | 0 |
| DG19011 | 845,0 | 0,0 | 120,0 | Não | Sim | 0,629 |
| DG19012 | 0,0 | 20,0 | 120,0 | Não | Não | 0 |
| DG19013 | 845,0 | 20,0 | 120,0 | Não | Sim | 0,674 |
| DG19014 | 0,0 | 10,0 | 100,0 | Não | Não | 0 |
| DG19015 | 845,0 | 10,0 | 100,0 | Não | Sim | 0,587 |
| DG19016 | 422,5 | 0,0 | 100,0 | Não | Não | 0 |
| DG19017 | 422,5 | 20,0 | 100,0 | Não | Não | 0 |
| DG19018 | 422,5 | 10,0 | 80,0 | Não | Não | 0 |
| DG19019 | 422,5 | 10,0 | 120,0 | Não | Não | 0 |
| DG19020 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | Não | Não | 0 |
| DG19021 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | Não | Não | 0 |
| DG19022 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | Não | Não | 0 |

t0 – 0 dias; t1 – 1 mês; t2 – 3 meses.

Tabela 4.8 - Quantidade de precipitado a 40°C 75%HR

| FORMAÇÃO DE PRECIPITADO 40°C 75%HR | | | | | | |
|---|---|---------------------------|----------------------------------|-----------|------------|------------------------|
| LOTE | Cloreto de Cálcio (mg/200mL) | BHT (mg/200mL) | Vitamina E (mg/200mL) | t0 | t1 | t2 (gramas) |
| DG19006 | 0,0 | 0,0 | 80,0 | Não | Não | 0 |
| DG19007 | 845,0 | 0,0 | 80,0 | Não | Sim | 0,772 |
| DG19008 | 0,0 | 20,0 | 80,0 | Não | Não | 0 |
| DG19009 | 845,0 | 20,0 | 80,0 | Não | Sim | 0,717 |
| DG19010 | 0,0 | 0,0 | 120,0 | Não | Não | 0 |
| DG19011 | 845,0 | 0,0 | 120,0 | Não | Sim | 0,710 |
| DG19012 | 0,0 | 20,0 | 120,0 | Não | Não | 0 |
| DG19013 | 845,0 | 20,0 | 120,0 | Não | Sim | 0,805 |
| DG19014 | 0,0 | 10,0 | 100,0 | Não | Não | 0 |
| DG19015 | 845,0 | 10,0 | 100,0 | Não | Sim | 0,791 |
| DG19016 | 422,5 | 0,0 | 100,0 | Não | Não | 0 |
| DG19017 | 422,5 | 20,0 | 100,0 | Não | Não | 0 |
| DG19018 | 422,5 | 10,0 | 80,0 | Não | Não | 0 |
| DG19019 | 422,5 | 10,0 | 120,0 | Não | Não | 0 |
| DG19020 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | Não | Não | 0 |
| DG19021 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | Não | Não | 0 |
| DG19022 | 422,5 | 10,0 | 100,0 | Não | Não | 0 |

t0 – 0 dias; t1 – 1 mês; t2 – 3 meses.

Analisando os resultados obtidos, foi possível concluir que a variação de pH em cada amostra após um e três meses de conservação em ambas as condições de armazenamento não é crítica, apresentando apenas ligeiras variações que se podem considerar desprezáveis.

As amostras com o nível máximo de cloreto de cálcio apresentam um valor de pH – aproximadamente 3,80 – inferior às amostras com nível intermédio do mesmo sal – aproximadamente 3,95 – e estas, por conseguinte, apresentam um valor de pH inferior às amostras sem o sal de cálcio – aproximadamente 4,20, podendo concluir-se a priori que a quantidade do sal de cálcio selecionado será um fator significativo no pH da solução.

Quanto à formação de precipitado, apesar do sal utilizado ter sido alterado, as amostras com a quantidade máxima definida de cloreto de cálcio precipitaram. Assim, apesar de não ser possível alcançar um modelo estatisticamente válido devido à falta de respostas obtidas nos outros níveis estudados, foi possível concluir que este era um fator crítico para a estabilidade física da formulação, ver Apêndice B.

Na Figura 4.2 e na Figura 4.3 estão ilustrados exemplos de amostras sem cloreto de cálcio e com cloreto de cálcio no nível máximo, respetivamente, onde se pode verificar a presença de precipitado apenas nas amostras com cálcio e uma maior quantidade de precipitado na amostra armazenada a 40°C e 75%HR, relativamente à armazenada a 25°C e 60%HR.

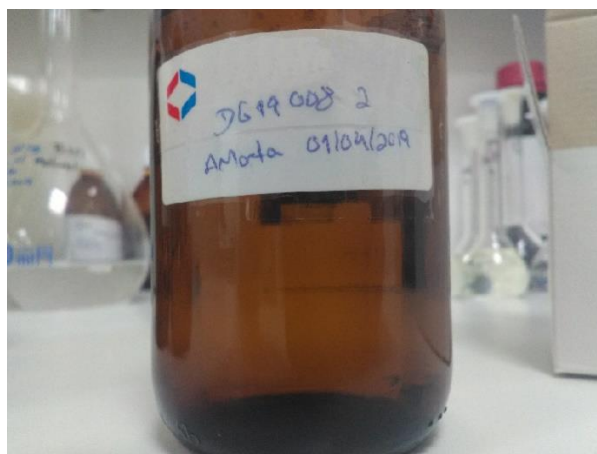


Figura 4.2 - Exemplo de amostra sem a presença de cloreto de cálcio (DG19008 - 2)

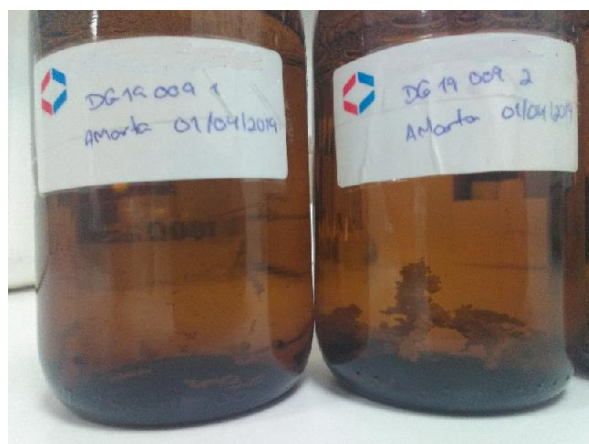


Figura 4.3 - Exemplo de amostras com nível máximo de cloreto de cálcio: DG19009 1 – armazenada a 25°C e 60%HR durante 1 mês; DG19009 2 – armazenada a 40°C e 75%HR durante 1 mês

Para além da formação de uma maior quantidade de precipitado nas amostras armazenadas em condições de estabilidade acelerada, foi possível verificar que todas estas apresentavam uma tonalidade acastanhada ao fim de três meses, aspeto não verificado nas amostras armazenadas a 25°C e 60%HR que se mantiveram com tom amarelo ao longo do tempo de armazenamento, ver Figura 4.4.

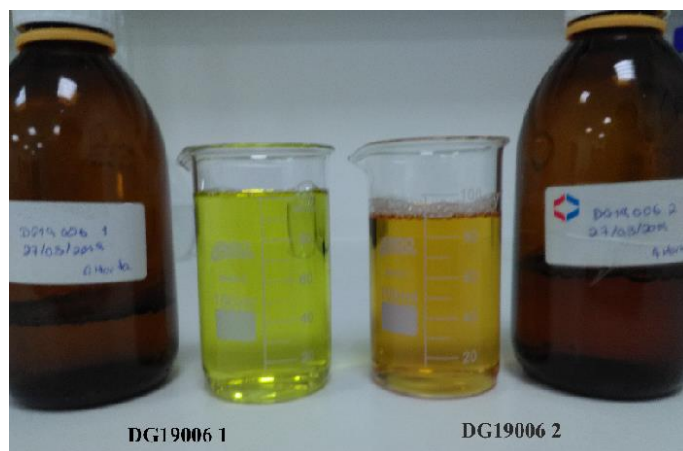


Figura 4.4 - Exemplo da tonalidade de amostras: DG19006 1 – armazenada a 25°C, 60%HR durante 3 meses; DG19006 2 – armazenada a 40°C, 75% HR durante três meses

4.2.3. Análise e interpretação dos modelos

Este subcapítulo é constituído apenas por um resumo dos modelos estatisticamente válidos obtidos, enquanto que o processo completo de modelação de todos os modelos trabalhados está descrito no Apêndice B.

4.2.3.1. Modelo da variação do teor de vitamina A após 1 mês, armazenado a 25°C e 60%HR

A Tabela 4.9 resume as características finais do modelo aplicado à variação do teor de vitamina A após 1 mês, para as amostras armazenadas a 25°C e 60% HR.

Tabela 4.9 - Resumo do modelo de variação do teor de vitamina A em 1 meses, armazenado a 25°C e 60%HR - MLR

| Tipo de modelação | Parâmetros de ajuste | Ajuste no modelo | | Análise de variância (ANOVA) |
|-------------------|---|------------------|---|--|
| | | <i>Outliers</i> | Fatores/interações significativos | |
| MLR | $R^2 = 0,932$ $Q^2 = 0,766$ $CV = 2,787$ $N = 17$ experiências | Não se verifica | $Ca*Ca$ $Vit.E*Vit.E$ $BHT*Vit.E$ | p regressão = 0,000 DP regressão = 13,5019 p lack of fit = 0,429 DP resíduos (erro) = 2,82536 DP replicados (erro) = 2,28546 |

Ca – Cloreto de cálcio; BHT – Butil-hidroxitolueno; Vit.E – Vitamina E; MLR – Regressão linear múltipla; R^2 – Coeficiente de correlação; Q^2 – Coeficiente de previsão; CV – Coeficiente de variação; N – Número de experiências; p – Probabilidade; DP – Desvio padrão.

Nos gráficos de previsão, Figura 4.5, é demonstrado que quanto maior for a concentração de BHT, menor será o decréscimo de vitamina A pois a relação entre decréscimo do teor de vitamina A e teor de BHT corresponde aproximadamente a uma reta no gráfico central, ou seja, apresentam uma correlação direta, ainda que apresente um declive pouco acentuado.

Quanto ao teor de cálcio e à vitamina E, os gráficos de previsão sugerem que a sua concentração mínima diminua o decréscimo de vitamina A na solução oral. A curvatura do gráfico de decréscimo de vitamina A *versus* teor de cálcio/vitamina E sugere a existência de interações para cada um destes fatores.

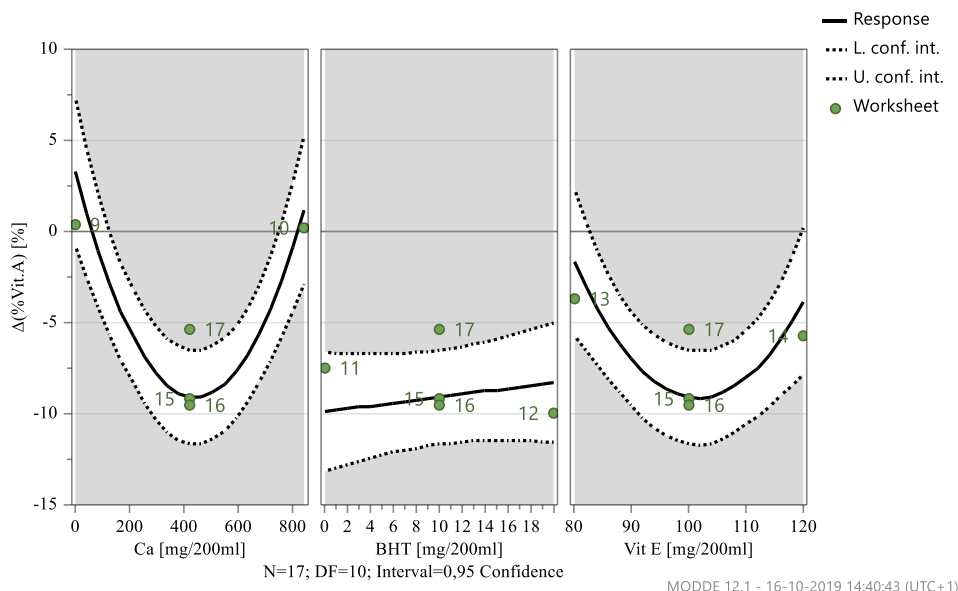


Figura 4.5 - Previsão da resposta em função da variação da quantidade dos fatores significativos, variação de vitamina A após 1 mês 25°C e 60%HR

As gamas ótimas dos fatores estudados para otimização da formulação, em termos de estabilidade da vitamina A na solução oral, são apresentadas na Figura 4.6.

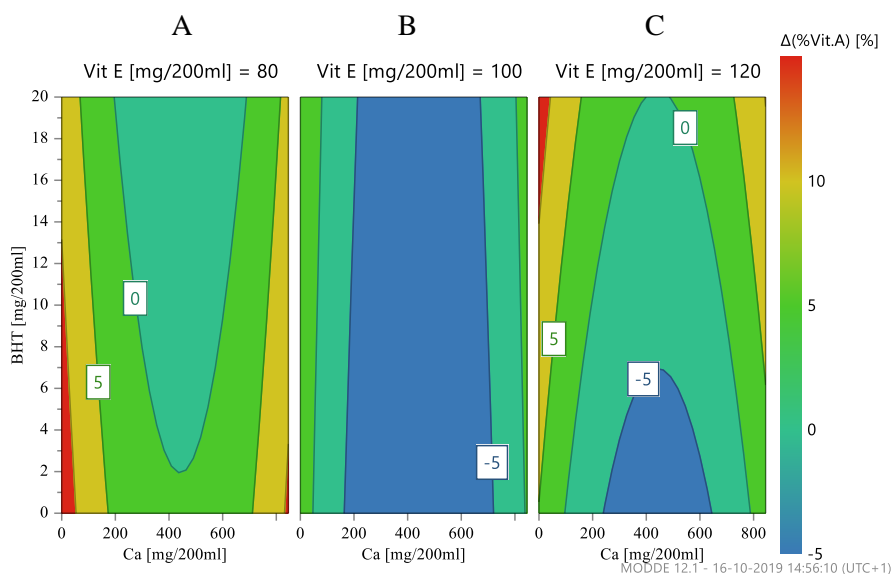


Figura 4.6 - Gama ótima de valores dos fatores estudados para otimização da formulação, variação de vitamina A após 1 mês 25°C e 60%HR: A) 80 mg/200ml de Vit. E; B) 100 mg/200ml de Vit. E; C) 120 mg/200ml de Vit. E.

4.2.3.2. Modelo da variação do teor de vitamina A após 1 mês, armazenado a 40°C e 75%HR

A Tabela 4.10 resume as características finais do modelo aplicado à variação do teor de vitamina A após 1 mês, para as amostras armazenadas a 40°C e 75% HR.

Tabela 4.10 - Resumo do modelo de variação do teor de vitamina A em 1 mês, armazenado a 40°C e 75%HR - MLR

| Tipo de modelação | Parâmetros de ajuste | Ajuste no modelo | | Análise de variância (ANOVA) |
|-------------------|---|------------------|---|---|
| | | Outliers | Fatores/interações significativos | |
| MLR | $R^2 = 0,936$ $Q^2 = 0,825$ $CV = 2,787$ $N = 17$ experiências | Não se verifica | $Ca*Ca$ $Vit.E*Vit.E$ $BHT*Vit.E$ | p regressão = 0,000 DP regressão = 13,783 p lack of fit = 0,652 DP resíduos (erro) = 2,78742 DP replicados (erro) = 3,00056 |

Ca – Cloreto de cálcio; BHT – Butil-hidroxitolueno; Vit.E – Vitamina E; MLR – Regressão linear múltipla; R^2 – Coeficiente de correlação; Q^2 – Coeficiente de previsão; CV – Coeficiente de variação; N – Número de experiências; p – Probabilidade; DP – Desvio padrão.

Nos gráficos de previsão, Figura 4.7, é demonstrado que quanto maior for a concentração de BHT, menor será o decréscimo de vitamina A pois a relação entre decréscimo do teor de vitamina A e teor de BHT corresponde aproximadamente a uma reta no gráfico central, ou seja, apresentam uma correlação direta, ainda que apresente um declive pouco acentuado.

Quanto ao teor de cálcio e à vitamina E, os gráficos de previsão sugerem que a sua concentração mínima diminua o decréscimo de vitamina A na solução oral. A curvatura do gráfico de decréscimo de vitamina A versus teor de cálcio/vitamina E sugere a existência de interações para cada um destes fatores.

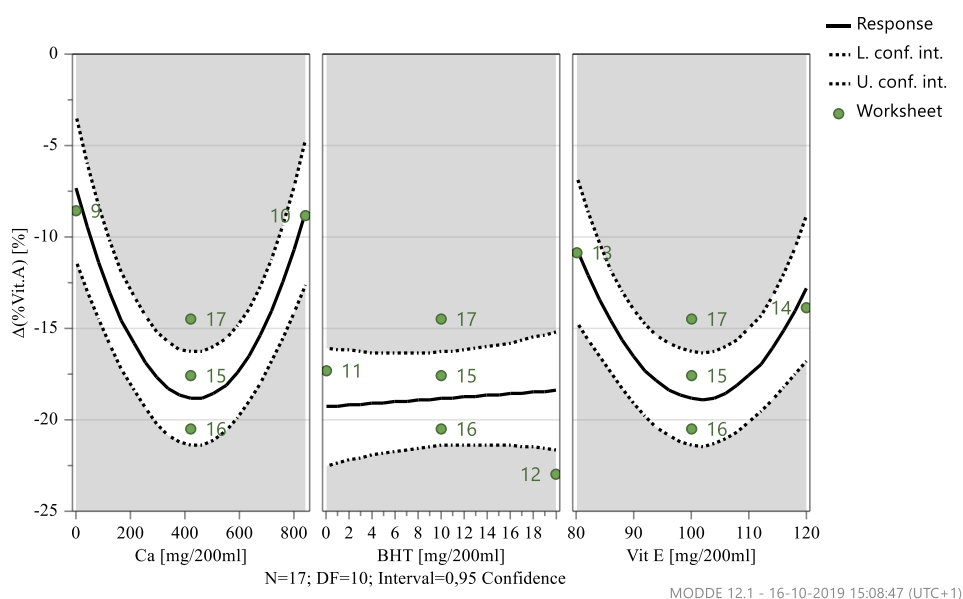


Figura 4.7 - Previsão da resposta em função da variação da quantidade dos fatores significativos, variação de vitamina A após 1 mês 40°C e 75%HR

As gamas ótimas dos fatores estudados para otimização da formulação, em termos de estabilidade da vitamina A na solução oral, são apresentadas na Figura 4.8.

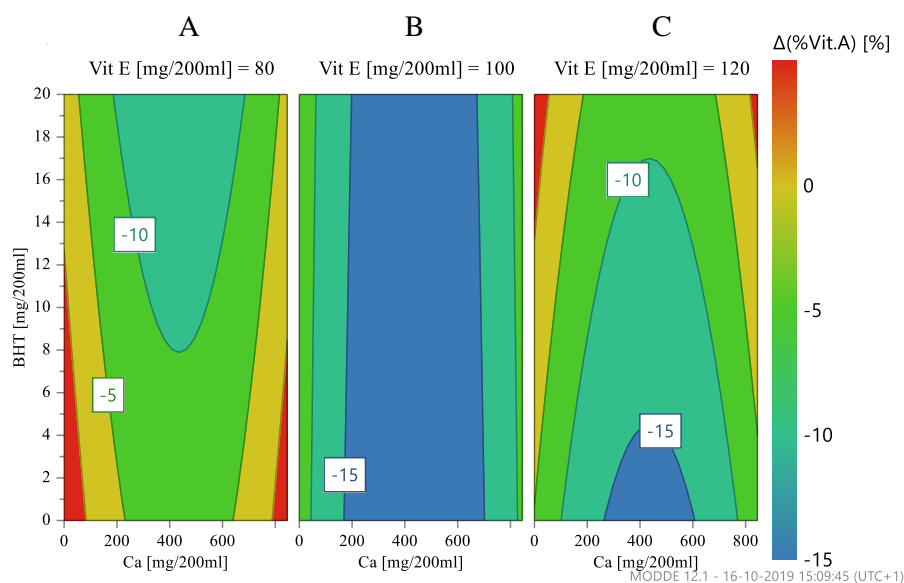


Figura 4.8 - Gama ótima de valores dos fatores estudados para otimização da formulação, variação de vitamina A após 1 mês 40°C e 75%HR: A) 80 mg/200ml de Vit. E; B) 100 mg/200ml de Vit. E; C) 120 mg/200ml de Vit. E

4.2.3.3. Modelo da variação do teor de vitamina A após 3 meses, armazenado a 40°C e 75%HR

A Tabela 4.11 resume as características finais do modelo aplicado à variação do teor de vitamina A em 3 meses, para as amostras armazenadas a 40°C e 75% HR.

Tabela 4.11 - Resumo do modelo de variação do teor de vitamina A em 3 meses, armazenado a 40°C e 75%HR - MLR

| Tipo de modelação | Parâmetros de ajuste | Ajuste no modelo | | Análise de variância (ANOVA) |
|-------------------|---|------------------|-----------------------------------|--|
| | | Outliers | Fatores/interações significativos | |
| MLR | R ² = 0,850 Q ² = 0,644 CV = 0,566 N = 17 experiências | Não se verifica | BHT Ca*Ca Vit.E*Vit.E | p regressão = 0,000 DP regressão = 11,0949 p lack of fit = 0,177 DP resíduos (erro) = 3,13619 DP replicados (erro) = 1,51328 |

Ca – Cloreto de cálcio; BHT – Butil-hidroxitolueno; Vit.E – Vitamina E; MLR – Regressão linear múltipla; R² – Coeficiente de correlação; Q² – Coeficiente de previsão; CV – Coeficiente de variação; N – Número de experiências; p – Probabilidade; DP – Desvio padrão.

Os gráficos de previsão, Figura 4.9, indicam que o teor mínimo de cloreto de cálcio, o teor máximo de BHT e o de vitamina E permitem minimizar o decréscimo do teor de vitamina A ao longo do tempo.

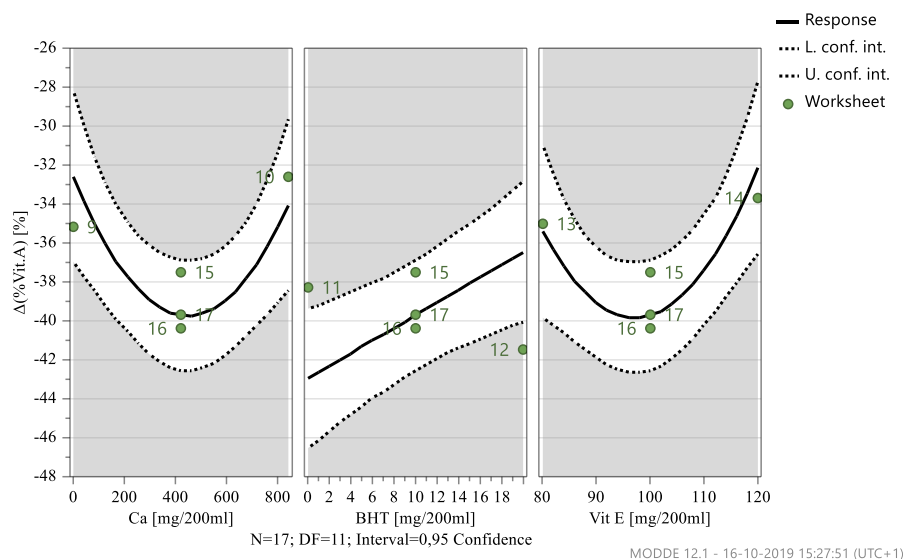


Figura 4.9 - Previsão da resposta em função da variação da quantidade dos fatores significativos, variação de vitamina A após 3 meses 40°C e 75%HR

Analisando a Figura 4.10, podem-se identificar as gamas ótimas de concentrações para atingir este objetivo. Nos gráficos de previsão é demonstrado que quanto maior for a concentração de BHT, menor será o decréscimo de vitamina A pois a relação entre decréscimo do teor de vitamina A e teor de BHT corresponde aproximadamente a uma reta no gráfico central, ou seja, apresentam uma correlação direta.

Quanto ao teor de cálcio, a curvatura do gráfico de decréscimo de vitamina A *versus* teor de cálcio sugere a existência de interações para este fator.

Por último, em relação à vitamina E, é evidenciado que a sua quantidade máxima favorece um menor decréscimo do teor de vitamina A, por ser o gráfico que tem uma maior área à qual corresponde a zona ótima. Também neste caso, a curvatura do gráfico de decréscimo de vitamina A *versus* teor de vitamina E sugere a existência de interações para este fator.

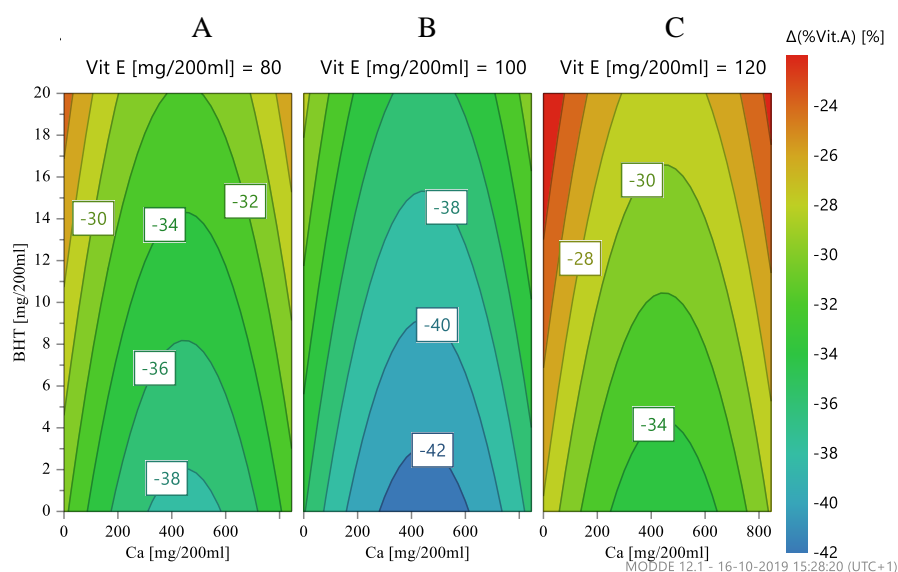


Figura 4.10 - Gama ótima de valores dos fatores estudados para otimização da formulação, variação de vitamina A após 3 meses 40°C e 75%HR: A) 80 mg/200ml de Vit. E; B) 100 mg/200ml de Vit. E; C) 120 mg/200ml de Vit. E.

Indo ao encontro da gama ótima de valores apresentada e dos gráficos de previsão de resposta em função da concentração dos fatores, a fórmula otimizada é apresentada na Tabela 4.12, onde a ausência de cloreto de cálcio, 20 mg de BHT por 200 ml de solução e 120 mg de vitamina E por 200ml de solução são os teores sugeridos para cada fator estudado, de forma a obter a melhor formulação, quando o objetivo é diminuir o decréscimo de vitamina A.

Tabela 4.12 - Formulação ótima e contribuição dos fatores em estudo: teor de cloreto de cálcio, BHT e vitamina E, variação de vitamina A 3 meses 40°C e 75%HR

| Fator | Valor ótimo (mg/200mL) | Contribuição do fator (%) |
|-------------------|------------------------|---------------------------|
| Cloreto de cálcio | 0 | 44,65 |
| BHT | 20 | 10,73 |
| Vitamina E | 120 | 44,62 |

4.2.3.4. Modelo do valor de pH após 3 meses, armazenado a 25°C e 60%HR

A Tabela 4.13 resume as características finais do modelo aplicado ao valor de pH após 3 meses, para as amostras armazenadas a 25°C e 60% HR.

Tabela 4.13 - Resumo do modelo do valor de pH em 3 meses, armazenado a 25°C e 60%HR - MLR

| Tipo de modelação | Parâmetros de ajuste | Ajuste no modelo | | Análise de variância (ANOVA) |
|-------------------|---|------------------|-----------------------------------|---|
| | | Outliers | Fatores/interações significativos | |
| MLR | R ² = 0,995 Q ² = 0,991 CV = 0,015 N = 17 experiências | Não se verifica | Ca BHT*BHT | p regressão = 0,000 DP regressão = 0,424205 p <i>lack of fit</i> = 0,615 DP resíduos (erro) = 0,0150019 DP replicados (erro) = 0,015275 |

Ca – Cloreto de cálcio; BHT – Butil-hidroxitolueno; MLR – Regressão linear múltipla; R² – Coeficiente de correlação; Q² – Coeficiente de previsão; CV – Coeficiente de variação; N – Número de experiências; p – Probabilidade; DP – Desvio padrão.

Os gráficos de previsão, Figura 4.11, indicam que o teor mínimo de cloreto de cálcio e o teor médio de BHT permitem alcançar o intervalo de pH alvo (4 - 4,5).

A reta observada no gráfico de pH versus cloreto de cálcio indica uma correlação direta existente entre este fator e a resposta, num intervalo de valores de pH entre 3,7 e 4,2 aproximadamente.

O gráfico de pH versus BHT apresenta uma linha praticamente horizontal (curvatura muito ligeira) o que sugere que o valor de pH é quase independente do valor de BHT. Esta observação é concordante com o facto do coeficiente BHT apresentar uma contribuição líquida de apenas 1% para esta resposta, conforme evidenciado pela Tabela 4.14.

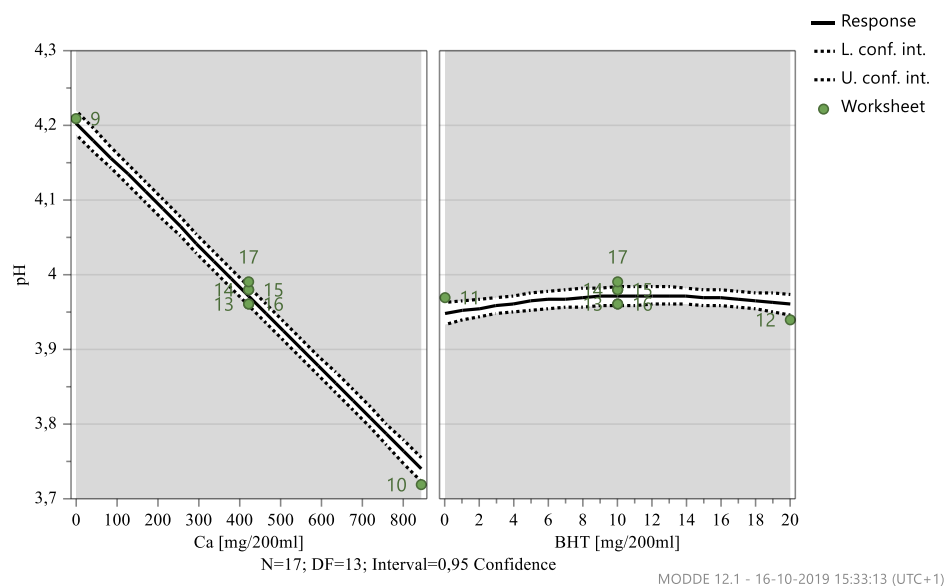


Figura 4.11 - Previsão da resposta em função da variação da quantidade dos fatores significativos, valor do pH em 3 meses 25°C e 60%HR

No gráfico de gama ótima de valores, Figura 4.12, é possível verificar de igual forma que concentrações inferiores de cálcio otimizam o valor de pH das soluções para valores pretendidos.

Na Tabela 4.14, percebe-se pela contribuição de cada fator que a concentração de cloreto de cálcio é extremamente significativa (99,25% de contribuição) e que deverá ser perto da concentração mínima estudada (0mg/200ml de solução) enquanto que o BHT apresenta uma contribuição inferior a 1% pelo que não se teve em conta o seu valor ótimo para esta resposta.

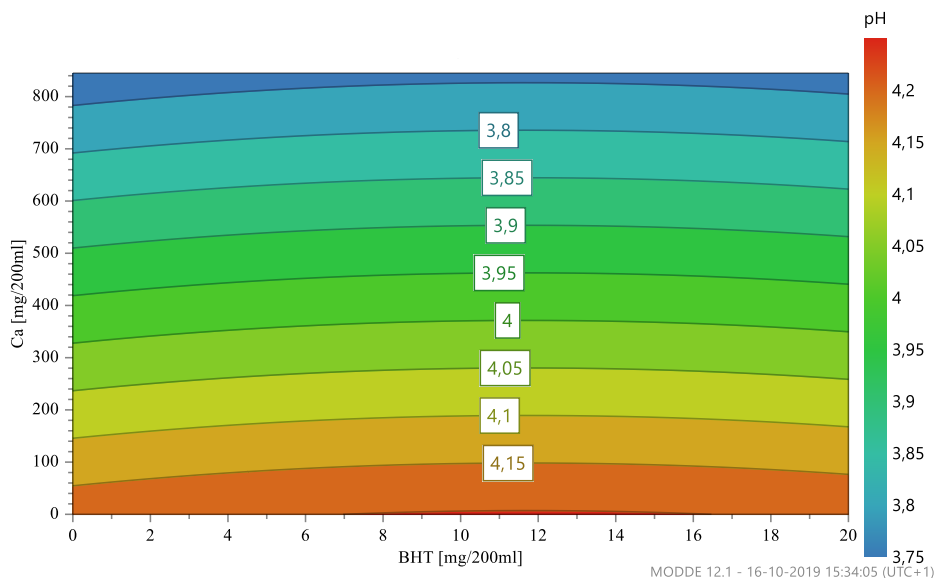


Figura 4.12 - Gama ótima de valores dos fatores estudados para otimização da formulação, valor do pH em 3 meses 25°C e 60%HR

Tabela 4.14 - Formulação ótima e contribuição dos fatores em estudo: teor de cloreto de cálcio e BHT, valor do pH em 3 meses 25°C e 60%HR

| Fator | Valor ótimo (mg/200mL) | Contribuição do fator (%) |
|-------------------|------------------------|---------------------------|
| Cloreto de cálcio | 0,0014 | 99,25 |
| BHT | 11,776 | 0,75 |
| Vitamina E | --- | 0 |

4.2.3.5. Modelo do valor de pH após 3 meses, armazenado a 40°C e 75%HR

A Tabela 4.15 resume as características finais do modelo aplicado ao valor de pH após 3 meses, para as amostras armazenadas a 40°C e 75% HR.

Tabela 4.15 - Resumo do modelo do valor de pH em 3 meses, armazenado a 40°C e 75%HR - MLR

| Tipo de modelação | Parâmetros de ajuste | Ajuste no modelo | | Análise de variância (ANOVA) |
|-------------------|---|------------------|-----------------------------------|--|
| | | Outliers | Fatores/interações significativos | |
| MLR | R ² = 0,996 Q ² = 0,994 CV = 0,01166 N = 16 experiências | Experiência 6 | Ca | p regressão = 0,000 DP regressão = 0,486895 p <i>lack of fit</i> = 0,484 DP resíduos (erro) = 0,0116567 DP replicados (erro) = 0,00999 |

Ca – Cloreto de cálcio; MLR – Regressão linear múltipla; R² – Coeficiente de correlação; Q² – Coeficiente de previsão; CV – Coeficiente de variação; N – Número de experiências; p – Probabilidade; DP – Desvio padrão.

O gráfico de previsão, Figura 4.13, devolvidos pelo *software* indicam que o teor mínimo de cloreto de cálcio permite alcançar o intervalo de pH alvo (4 - 4,5).

A reta observada no gráfico de pH versus cloreto de cálcio indica uma correlação direta existente entre este fator e resposta.

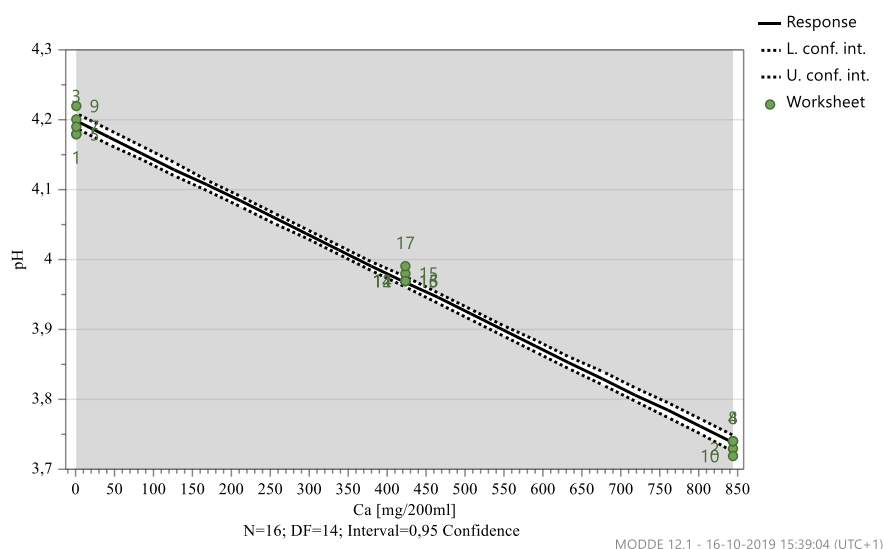


Figura 4.13 - Previsão da resposta em função da variação da quantidade dos fatores significativos, valor do pH em 3 meses 40°C e 75%HR

Havendo apenas um fator significativo neste modelo (cloreto de cálcio), é devolvido como tendo 100% de contribuição na resposta em estudo com um valor ótimo de 0mg/200ml para valores de pH entre 4 e 4,5 como resposta ótima, ver Tabela 4.16.

Tabela 4.16 - Formulação ótima e contribuição dos fatores em estudo: teor de cloreto de cálcio, valor do pH em 3 meses 40°C e 75%HR

| Fator | Valor ótimo (mg/200mL) | Contribuição do fator (%) |
|-------------------|------------------------|---------------------------|
| Cloreto de cálcio | 0 | 100 |
| BHT | --- | 0 |
| Vitamina E | --- | 0 |

4.3. Definição e validação de métodos analíticos

Os métodos analíticos utilizados neste trabalho correspondem a métodos internos cuja aplicação às formulações em estudo foi demonstrada através da respetiva validação, utilizando como base a formulação com maior nível de interferência (teor máximo) para os três fatores estudados. Neste trabalho, foram executadas validações analíticas dos métodos de doseamento de vitamina A e de vitamina E. O processo de validação não será apresentado em detalhe de modo a preservar a confidencialidade do produto e dos respetivos métodos de análise.

A validação do método analítico de doseamento da vitamina A e vitamina E no produto acabado avaliou os parâmetros seletividade, linearidade, exatidão, precisão e estabilidade das soluções analíticas, em conformidade com os requisitos estabelecidos pelo ICH [24] para métodos de quantificação de componentes principais.

4.3.1. Resultados da validação analítica do método de doseamento da vitamina A

O resumo dos resultados relativos à validação analítica do método de doseamento da vitamina A é apresentado na Tabela 4.17, sendo complementado no Apêndice C.

Analisando os cromatogramas relativos ao parâmetro da seletividade, ver Apêndice C, concluiu-se que os tempos de retenção do analito alvo – vitamina A – e dos restantes analitos presentes na solução oral – excipientes, outras vitaminas e solventes utilizados na preparação das amostras para análise – são bastante distintos. A resolução entre o analito e o pico mais próximo é superior a 2, não havendo assim qualquer interferência de outros componentes da amostra na leitura do analito alvo.

Quanto ao parâmetro da linearidade, verificou-se que a reta de regressão do gráfico do sinal devolvido em função da concentração é linear e que o gráfico dos resíduos em função da concentração tomou uma distribuição aleatória próxima do zero.

Os resultados obtidos para cada parâmetro da validação, ver Apêndice C, cumprem os respetivos critérios de aceitação, podendo concluir-se deste modo que o método analítico é adequado ao doseamento do analito pretendido – vitamina A – no suplemento alimentar.

Tabela 4.17 - Resultados da validação analítica do método de doseamento da vitamina A

| Parâmetro de Validação | Critério de aceitação | Resultados |
|---|--|---|
| Seletividade | Nenhuma interferência de solvente/placebo/restantes vitaminas na resposta do analito alvo | Cumpre |
| Linearidade | $R^2 \geq 0,99$ Desvio dos fatores de resposta (RF) $\leq 2\%$ CV dos fatores de resposta $\leq 3\%$ Inspeção visual da recta: Linear | $R^2 = 0,99985$ Desvio dos fatores resposta $\leq 2\%$ CV = 0,41% Inspeção da reta: Satisfaz |
| Exatidão | $97,0\% \leq \text{Recuperação individual} \leq 103,0\%$ $98,0\% \leq \text{Recuperação média} \leq 102,0\%$ | 100,7% a 102,7% Recuperação média = 101,8% |
| Precisão | | |
| Precisão do sistema | CV $\leq 1\%$ | CV = 0,35% $\leq 1\%$ |
| Repetibilidade | CV $\leq 2\%$ | CV = 0,15% $\leq 2\%$ |
| Precisão Intermédia | CV $\leq 3\%$ | CV = 0,21% $\leq 3\%$ |
| Gama de trabalho | Mínimo: 80% – 160% | Cumpre |
| Estabilidade das soluções analíticas | As soluções analíticas são consideradas estáveis se a variação de conteúdo não for superior a 2% sob condições de armazenamento definidas | Estáveis durante 24 horas, armazenadas a 5°C protegidas da luz |

CV – Coeficiente de variação; R^2 – coeficiente de determinação.

4.3.2. Resultados da validação analítica do método de doseamento da vitamina E

O resumo dos resultados relativos à validação analítica do método de doseamento da vitamina E é apresentado na Tabela 4.18.

Os cromatogramas relativos ao parâmetro da seletividade do método de doseamento da vitamina E, ver Apêndice D, permitiram concluir, tal como no método de doseamento da vitamina A, que o analito alvo – vitamina E – e os restantes componentes da fórmula têm tempos de retenção suficientemente distintos de forma a possibilitar a análise seletiva da vitamina E (resolução superior a 2 relativamente ao pico mais próximo).

Quanto ao parâmetro da linearidade, da mesma forma que na validação do método de doseamento da vitamina A, verificou-se que a reta de regressão do sinal devolvido em função da concentração é linear e que o gráfico dos resíduos em função da concentração tomou uma distribuição aleatória próxima do zero, ver Apêndice D.

Os resultados obtidos para cada parâmetro da validação cumprem os respetivos critérios de aceitação, podendo concluir-se deste modo que o método analítico é adequado ao doseamento do

analito pretendido – vitamina E – no produto acabado do suplemento alimentar multivitamínico objeto deste trabalho.

Tabela 4.18 - Resultados da validação analítica do método de doseamento da vitamina E

| Parâmetro de Validação | Critério de aceitação | Resultados |
|---|--|---|
| Seletividade | Nenhuma interferência de solvente/placebo/restantes vitaminas na resposta do analito alvo | Cumpre |
| Linearidade | $R^2 \geq 0,99$ Desvio dos fatores de resposta (RF) $\leq 2\%$ CV dos fatores de resposta $\leq 3\%$ Inspeção visual da recta: Linear | $R^2 = 0,99919$ Desvio dos fatores resposta $\leq 2\%$ $CV = 0,86\% \leq 3\%$ Inspeção da reta: Satisfaz |
| Exatidão | $97,0\% \leq \text{Recuperação individual} \leq 103,0\%$ $98,0\% \leq \text{Recuperação média} \leq 102,0\%$ | 98,0% a 100,0% Recuperação média = 98,7% |
| Precisão | | |
| Precisão do sistema | $CV \leq 1\%$ | $CV = 0,25\% \leq 1\%$ |
| Repetibilidade | $CV \leq 2\%$ | $CV = 0,19\% \leq 2\%$ |
| Precisão Intermédia | $CV \leq 3\%$ | $CV = 0,88\% \leq 3\%$ |
| Gama de trabalho | Mínimo: 80% – 160% | Cumpre |
| Estabilidade das soluções analíticas | As soluções analíticas são consideradas estáveis se a variação de conteúdo não for superior a 2% sob condições de armazenamento definidas | Estáveis durante 24 horas armazenadas a 5°C e a temperatura ambiente, protegidas da luz |

CV – Coeficiente de variação; R^2 – coeficiente de determinação.

4.4. Discussão dos resultados

Com este trabalho otimizou-se a formulação em estudo, com o objetivo de obter uma formulação física e quimicamente estável.

Foi possível através de desenho experimental, a partir de 17 experiências, obter conhecimento sobre a influência dos fatores cloreto de cálcio, BHT e vitamina E na variação das seguintes respostas:

- Variação do teor de vitamina A após 1 mês, com as amostras armazenadas a 25°C e 60% HR – a concentração máxima de BHT (20mg/200mL) contribui para um decréscimo da perda de vitamina A ao longo do tempo (Figura 4.5);

- Variação do teor de vitamina A após 1 mês, com as amostras armazenadas a 40°C e 75% HR – a concentração máxima de BHT (20mg/200mL) contribui para um decréscimo da perda de vitamina A ao longo do tempo (Figura 4.7);
- Variação do teor de vitamina A após 3 meses, com as amostras armazenadas a 40°C e 75% HR – a quantidade mínima de cloreto de cálcio (0mg/200mL) e as quantidades máximas de BHT (20mg/200mL) e vitamina E (120mg/200mL) contribuem para um decréscimo da perda de vitamina A ao longo do tempo;
- Valor do pH após 3 meses, com as amostras armazenadas a 25°C e 60% HR – quanto mais baixa for a quantidade de cloreto de cálcio (0mg/200mL) mais próximo de 4,5 será o valor de pH da solução (Figura 4.12);
- Valor do pH após 3 meses, com as amostras armazenadas a 40°C e 75% HR – quanto mais baixa for a quantidade de cloreto de cálcio (0mg/200mL) mais próximo de 4,5 será o valor de pH da solução (Figura 4.13).

Ainda que o estudo de formação de precipitado após 3 meses não tenha tido resultados suficientes para obter um modelo estatisticamente válido, foi possível concluir que o cloreto de cálcio é o fator mais significativo, uma vez que em todas as formulações em que este estava presente na sua concentração máxima (845mg/200mL) houve formação de precipitado após 1 e 3 meses.

Os resultados obtidos relativamente à variação do teor de vitamina A estão em concordância com as funções antioxidantes atribuídas ao BHT e à vitamina E, que permitem contrariar o principal mecanismo de degradação associado à vitamina A: oxidação.

Em termos de estabilidade física (formação de precipitado), não foi possível encontrar justificação para o cálcio ser o único oligoelemento capaz de induzir a formação de precipitado. A comparação de solubilidades dos sais dos oligoelementos presentes, indica o cloreto de cálcio como o sal mais hidrossolúvel pelo que a formação de precipitado deverá ser objeto de investigação posterior.

Assim, a formulação que cumpre os objetivos estabelecidos contém 0mg/200mL de cloreto de cálcio, 20mg/200mL de BHT e 120mg/200mL de vitamina E.

De seguida, validaram-se os métodos analíticos a aplicar na avaliação de rotina do suplemento alimentar para quantificação dos teores de vitamina A e vitamina E, confirmando que os mesmos são adequados para o fim a que se destinam. Os resultados das validações analíticas demonstraram que os métodos utilizados são precisos, exatos e lineares, nas gamas de concentrações aplicáveis para cada uma das vitaminas incluídas no estudo realizado.

5. Conclusões e propostas de trabalhos futuros

O desenvolvimento do suplemento alimentar multivitamínico, correspondente à associação das vitaminas A, D e E e oligoelementos sob a forma de solução oral, realizado neste trabalho, cumpriu parcialmente os objetivos inicialmente previstos, os quais foram definidos nas seguintes etapas:

1. Aplicação de um estudo de solubilidades;
2. Definição de propostas para formulação do suplemento alimentar;
3. Aplicação de desenho experimental na otimização da formulação;
4. Definição e validação de métodos analíticos.

Na primeira etapa aplicou-se um estudo primário com o propósito de ficar a conhecer os componentes que poderiam causar precipitação na formulação, onde se concluiu que o sal de cálcio era o componente crítico da solução.

Na segunda fase do projeto definiram-se propostas para uma nova formulação do suplemento alimentar através de um estudo baseado em referências bibliográficas, explicando as propriedades físicas e químicas de todos os componentes da formulação.

Deste estudo pode concluir-se que o BHT e a vitamina E são fortes agentes antioxidantes da vitamina A e que o agente conservante (sorbato de potássio) tem a sua função otimizada em soluções com pH entre 4,0 e 4,5. Portanto, as concentrações ótimas de BHT e vitamina E deveriam ser otimizadas e tornou-se essencial incluir o pH no estudo seguinte como resposta.

Através da aplicação do desenho de experiências CCF foi possível identificar a influência dos fatores tomados inicialmente como significativos (cloreto de cálcio, butil-hidroxitolueno e vitamina E) na variação das respostas (variação do teor de vitamina A, pH da solução e formação de precipitado), a partir de 17 experiências, possibilitando a determinação da combinação ótima dos fatores testados: 0mg/200mL de cloreto de cálcio, 20mg/200mL de butil-hidroxitolueno e 120mg/200mL de vitamina E.

Com a aplicação de um desenho experimental (estratégia multivariada) foi também possível detetar a existência de interações entre fatores (Vitamina E*cloreto de cálcio nos modelos da variação do teor vitamina A), algo que não poderia ser detetado caso fosse utilizado uma estratégia de variar um fator de cada vez (univariada).

O sal de cálcio foi alterado com base na sua solubilidade, permitindo estabelecer um nível de teor de sal de cálcio compatível com a fórmula galénica proposta, sem formação de precipitado, até 3 meses de conservação em condições de estabilidade acelerada. Estes estudos terão de ser prolongados no tempo para confirmar o teor máximo de sal de cálcio admissível.

Definida a formulação, procedeu-se à validação dos métodos analíticos utilizados no doseamento de vitamina A e vitamina E, os quais apresentaram bons resultados pois cumpriram todos os critérios de aceitação internos. Contudo ficou pendente a validação do método de quantificação da vitamina D, que será realizado como etapa seguinte no trabalho de desenvolvimento do produto.

Esta dissertação focou as primeiras etapas do desenvolvimento de um suplemento alimentar, estando ainda pela frente um longo percurso até à sua comercialização. Assim, apresentam-se como sugestões de continuidade deste trabalho os seguintes processos:

- Definição e validação do método de quantificação da vitamina D no produto em estudo;

- Testar a eficácia dos conservantes na fórmula selecionada, preferencialmente numa amostra com o nível mínimo de conservante admitido (90% do teor rotulado) de modo a assegurar a eficácia do conservante no pior caso possível;
- Realizar estudos de estabilidade nas condições climáticas previstas para comercialização (a definir por área de comercial) e em condições de estabilidade acelerada que permitam fazer uma previsão a curto prazo da estabilidade da fórmula selecionada.

Referências Bibliográficas

- [1] Apifarma, “Missão da Indústria Farmacêutica”. Consultado em Agosto de 2019 em: <https://www.apifarma.pt/apifarma/Paginas/Missao.aspx>.
- [2] INFARMED, “Autorização de introdução no mercado”. Consultado em Agosto de 2019 em: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado>.
- [3] Assembleia da República, “Diário da República - I Série - No 120 - 23 de junho 2015”.
- [4] A. S. Martins, A. L. Ponte, C. Mousinho, Fátima Bragança, F. Hergy, L. N. Guerra, M. Pedro, M. Silva, S. Duarte e V. Araújo “Boletim de Farmacovigilância” vol. 21, 2017 INFARMED
- [5] European Parliament and the Council of 16 December, *Regulation (EC) No 1333/2008 on food additives*, Official Journal of the European Union, 2008.
- [6] “ATRAL Farmacêutica: Produção, Investigação e Desenvolvimento.” Consultado em Agosto de 2019 em: <https://www.atral.pt/>.
- [7] European Commission, *EudraLex - Volume 4 - Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines / Public Health*, 2017. Consultado em Agosto de 2019 em: https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_en.
- [8] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Quality Risk Management Q9*, 2005.
- [9] Regulamento (UE) 2015/414 da Comissão de 12 de março de 2015, “Directiva 2002/46/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 10 de Junho de 2002”.
- [10] European Federation of Associations of Health Product Manufacturers, *Quality Guide*, 2nd ed. 2014.
- [11] World Health Organization Technical Report Series, *Annex 7 Application of Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) methodology to pharmaceuticals*, 2003.
- [12] W. Lund, *The pharmaceutical codex: principles and practice of pharmaceuticals*, 12th ed. London: The Pharmaceutical Press, 1994.
- [13] R. R. Eitenmiller, L. Ye, and W. O. Landen, *Vitamin analysis for the health and food sciences*, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.
- [14] G. F. Combs and J. P. McClung, *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*, 5th ed. London, San Diego: Elsevier/Academic Press, 2017.
- [15] International Alliance of Dietary/Food Supplement Associations, *Stability Testing for the Shelf Life Determination of Supplements*, London, 2016.
- [16] S. C. Vir, *Public Health Nutrition in Developing Countries*, 1st ed. Cambridge: Woodhead Publishing India, 2011.
- [17] Y. O. Li, J. Lam, L. L. Diosady, and S. Jankowski, *Antioxidant system for the preservation of vitamin A in ultra rice*, Food and Nutrition Bulletin, vol. 30, no. 1, pp. 82–89, 2009.
- [18] A. B. Kurzer, *The Protective Effect of Antioxidants on Vitamin A Stability in Nonfat Dry Milk During Thermally Accelerated Storage*, All Theses Dissertations, 2013.
- [19] S. C. Sweetman, *Martindale The Complete Drug Reference*, 36th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.

- [20] R. C. Rowe, P. J. Sheskey, and M. E. Quinn, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.
- [21] R. A. Nash and A. H. Wachter, *Pharmaceutical Process Validation*, 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 2003.
- [22] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Pharmaceutical Development Q8(R2)*, 2009.
- [23] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2)*, 1996.
- [24] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures*, 1995.
- [25] USP-NF, *Validation of Compendial Procedures*, Rockville, MD USP, pp. 1–5, 2007.
- [26] M. E. Swartz and I. Krull, *Method Validation and Robustness*. Consultado em Agosto de 2019 em: <http://www.chromatographyonline.com/method-validation-and-robustness?id=&pageID=1&sk=&date=>.
- [27] L. Eriksson, E. Johansson, N. K.- Wold, C. Wikstrom, and S. Wold, *Design of Experiments, Principles and Applications*, 3rd ed. Umetrics AB, 2000.
- [28] J. K. Telford, *A Brief Introduction to Design of Experiments*, Johns Hopkins APL Technical Digest, vol. 27, no. 3. pp. 224–232, 2007.
- [29] Sartorius Stedim Data Analytics, *User guide to MODDE 12 Version 12*. Umeå: Sartorius Stedim Biotech, 2017.
- [30] B. Singh, R. Bhatowa, C. Tripathi, and R. Kapil, *Developing micro-/nanoparticulate drug delivery systems using design of experiments*, International Journal of Pharmaceutical Investigation, vol. 1, no. 2, p. 75, Apr. 2011.
- [31] NIST/SEMATECH, *e-Handbook of Statistical Methods*, Consultado em Agosto de 2019 em: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>.
- [32] J. P. Davim, *Mechatronics and Manufacturing Engineering: Research and Development*, 1st ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2012.
- [33] D. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, 8th ed. Arizona: John Wiley & Sons, 2008.
- [34] V. Bühler, *Generic Drug Formulations*, 2nd ed. BASF Fine Chemicals, 1998.
- [35] V. Mishra, S. Thakur, A. Patil, and A. Shukla, *Quality by design (QbD) approaches in current pharmaceutical set-up*, Expert Opinion on Drug Delivery, vol. 15, no. 8. Taylor & Francis, pp. 737–758, Aug. 2018.
- [36] S. N. Politis, P. Colombo, G. Colombo, and D. M. Rekkas, *Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development*, Drug Development and Industrial Pharmacy, vol. 43, no. 6. Taylor & Francis, pp. 889–901, Jun. 2017.
- [37] T. C. M. Carraro, N. M. Khalil, and R. M. Mainardes, *Amphotericin B-loaded polymeric nanoparticles: Formulation optimization by factorial design*, Pharm. Dev. Technol., vol. 21, no. 2, pp. 140–146, Feb. 2016.
- [38] C. T. S. Turk, U. C. Oz, T. M. Serim, and C. Hascicek, *Formulation and optimization of nonionic surfactants emulsified nimesulide-loaded PLGA-based nanoparticles by design of experiments*, AAPS PharmSciTech, vol. 15, no. 1, pp. 161–176, Feb. 2014.

- [39] K. C. Petkar *et al.*, *Development of Novel Octanoyl Chitosan Nanoparticles for Improved Rifampicin Pulmonary Delivery: Optimization by Factorial Design*, AAPS PharmSciTech, vol. 19, no. 4, pp. 1758–1772, May 2018.

Apêndices

Apêndice A – Exemplos de desenho de experiências aplicados em indústria farmacêutica

Tabela A.1 – Exemplos de desenho de experiências aplicado em desenvolvimento farmacêutico

| Artigo | Ano | Descrição |
|---|------|--|
| <i>Quality by design (QbD) approaches in current pharmaceutical set-up</i> [35] | 2018 | Exposição dos tipos de desenho experimental e das respectivas aplicações que começam a ser utilizadas com frequência em indústria farmacêutica. |
| <i>Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development</i> [36] | 2017 | Substituição do desenvolvimento de produtos farmacêuticos através dos métodos “um fator de cada vez” por métodos estatísticos, através da aplicação de vários tipos de desenho de experiências. |
| <i>Amphotericin B-loaded polymeric nanoparticles: formulation optimization by factorial design</i> [37] | 2016 | Aplicação de um desenho fatorial $2^3 \times 3^1$ na otimização de uma formulação de nanopartículas contendo AmB., através do estudo das seguintes variáveis de entrada: quantidade de polímero e constituição da fase orgânica. |
| <i>Formulation and Optimization of Nonionic Surfactants Emulsified Nimesulide-Loaded PLGA-Based Nanoparticles by Design of Experiments</i> [38] | 2014 | Desenvolvimento de surfactantes não iônicos através da aplicação de um desenho fatorial completo 3^2 . Introdução da vitamina E TPGS e do polivinil álcool – PVA – como fatores de entrada e baseando o estudo nas seguintes respostas: eficiência de encapsulamento, tamanho de partículas, índice de polidispersividade e carga superficial. |
| <i>Development of Novel Octanoyl Chitosan Nanoparticles for Improved Rifampicin Pulmonary Delivery: Optimization by Factorial Design</i> [39] | 2018 | Desenvolvimento de nanopartículas para administração pulmonar através introdução de um desenho fatorial completo, 3^2 , fazendo variar as quantidades de octanoyl chitosan (OC) e rifampicin (Rif). |

Apêndice B – Modelos de otimização da fórmula do suplemento alimentar

A modelação matemática aplicada na otimização da fórmula seguiu a seguinte ordem:

1. Escolha do tipo de regressão a utilizar (MLR ou PLS) e ajuste (inicial) do modelo;
2. Análise dos parâmetros de ajuste iniciais do modelo;
3. Reajuste de modelo após eliminação de *outliers* e fatores/interações não significativas;
4. Análise dos parâmetros de reajuste do modelo;
5. Análise e interpretação do modelo – análise de variância, resíduos e dados observados *versus* previstos.

Modelo da variação do teor de vitamina A em 1 mês, armazenado a 25°C e 60%HR – Modelação do tipo MLR

A *worksheet* de fatores e respostas deste modelo corresponde à Tabela 4.3, com as respostas da variação de vitamina A após 1 mês a entrarem para este modelo.

1. Tipo de modelação: MLR
2. Parâmetros de ajuste iniciais do modelo

A Figura B.1 esquematiza os parâmetros iniciais do modelo da variação do teor de vitamina A após 1 mês, com as amostras armazenadas a 25°C e 60% HR. É possível verificar um bom valor de R^2 (superior a 0,8), um valor de Q^2 não aceitável (inferior a 0,60), uma validade do modelo superior a 0,25, e um bom valor de reprodutibilidade do ponto central (perto de 1). Com isto, o modelo necessita de ser reajustado de modo a aumentar a sua capacidade de previsão.

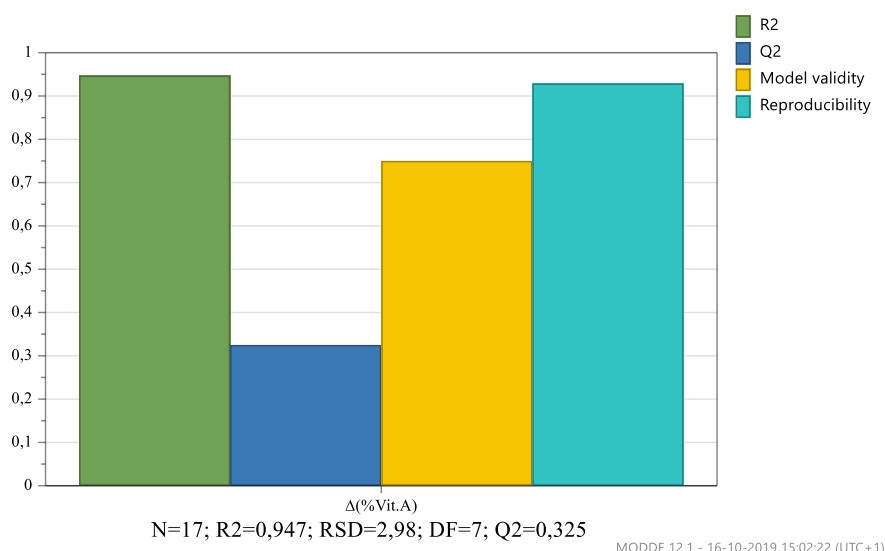


Figura B.1 - Parâmetros de ajuste iniciais do modelo MLR da variação do teor Vitamina A - 1 mês, 25°C 60%HR

3. Reajuste do modelo

Os gráficos de resíduos e de valores observados em função dos previstos, Figura B.2 e Figura B.3, indicam que não existem *outliers* no modelo, pelo que se prosseguiu para a análise de fatores e interações não significativas Figura B.4.

Ao retirar os coeficientes cujos efeitos produzidos são inferiores ao intervalo de confiança de 95% - não significativos – concluiu-se que os fatores significativos para a variação do teor de vitamina A após 1 mês a 25°C e 60% HR seriam as interações cloreto de cálcio*cloreto de cálcio, vitamina E*vitamina E e BHT*Vitamina E. Os fatores cloreto de cálcio, vitamina E e BHT apesar de não serem estatisticamente significativos, têm de ser mantidos no modelo porque os coeficientes significativos estão associados a interações destes três fatores, ver Figura B.5.

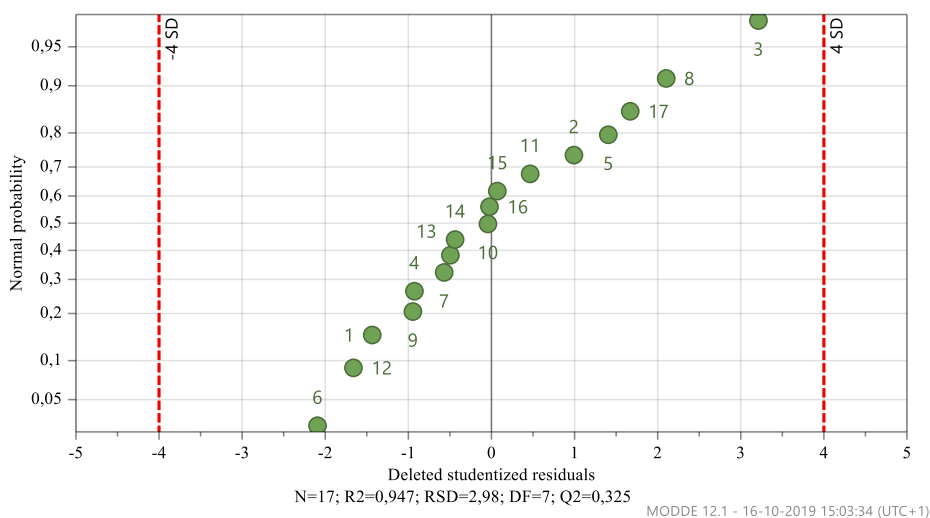


Figura B.2 - Gráficos de resíduos do modelo MLR da variação do teor Vitamina A – 1 mês, 25°C 60%HR

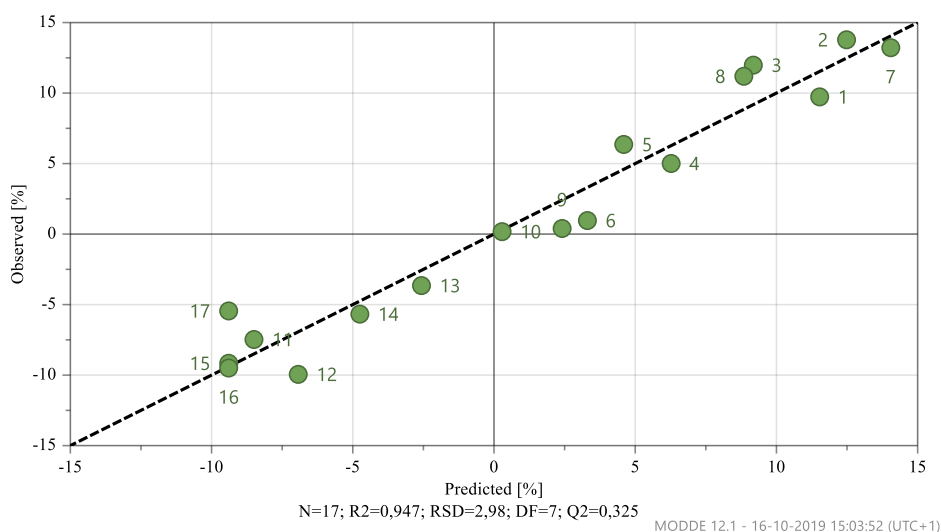


Figura B.3 - Gráfico de valores observados em função dos previstos do modelo MLR da variação do teor Vitamina A - 1 mês, 25°C 60%HR

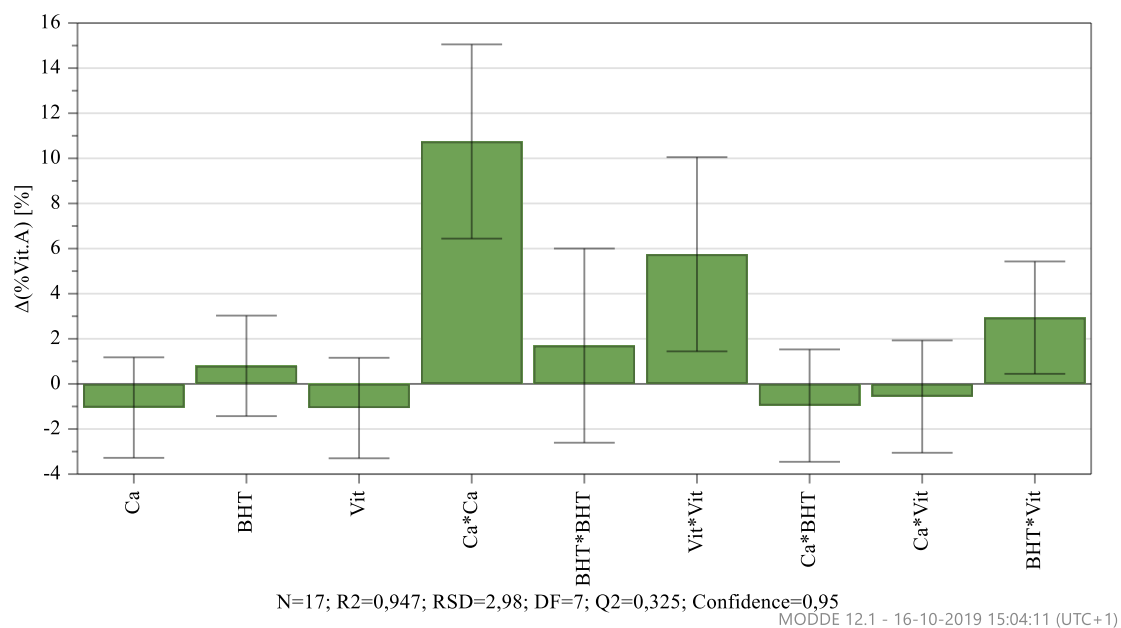


Figura B.4 - Coeficientes iniciais do modelo MLR da variação do teor Vitamina A – 1 mês, 25°C 60%HR

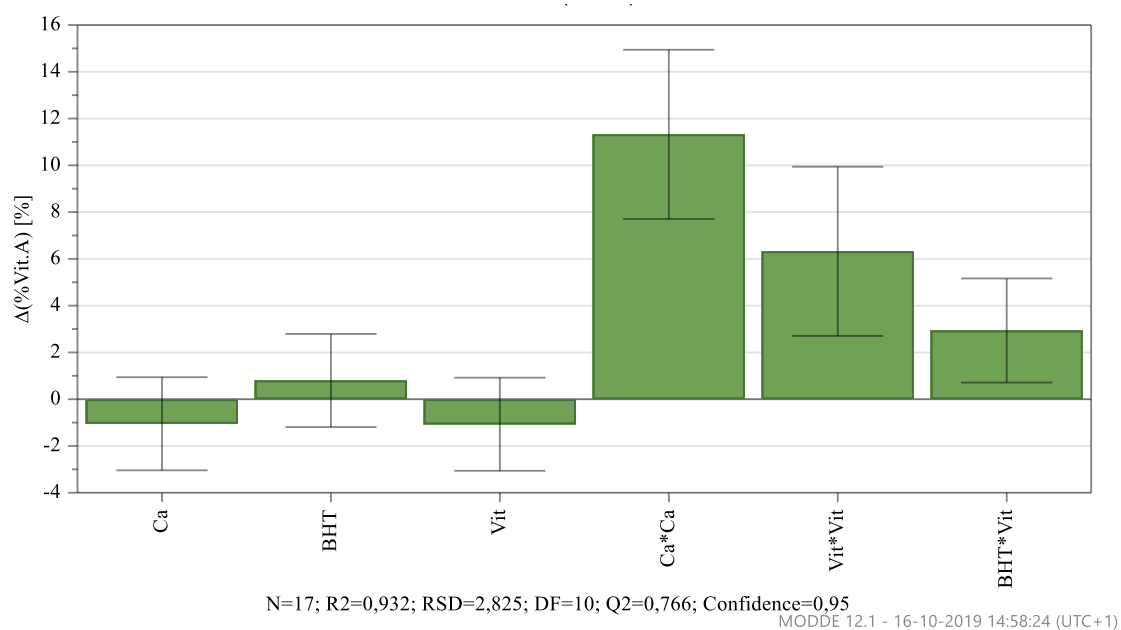


Figura B.5 - Coeficientes finais do modelo MLR da variação do teor Vitamina A – 1 mês, 25°C 60%HR

4. Parâmetros de reajuste do modelo

Depois de reajustado o modelo, o valor de R^2 permaneceu superior a 0,8, Q^2 subiu para valores razoáveis de previsão (superior a 0,6), enquanto que a validade de modelo permaneceu superior a 0,25, obtendo assim um modelo válido, ver Figura B.6

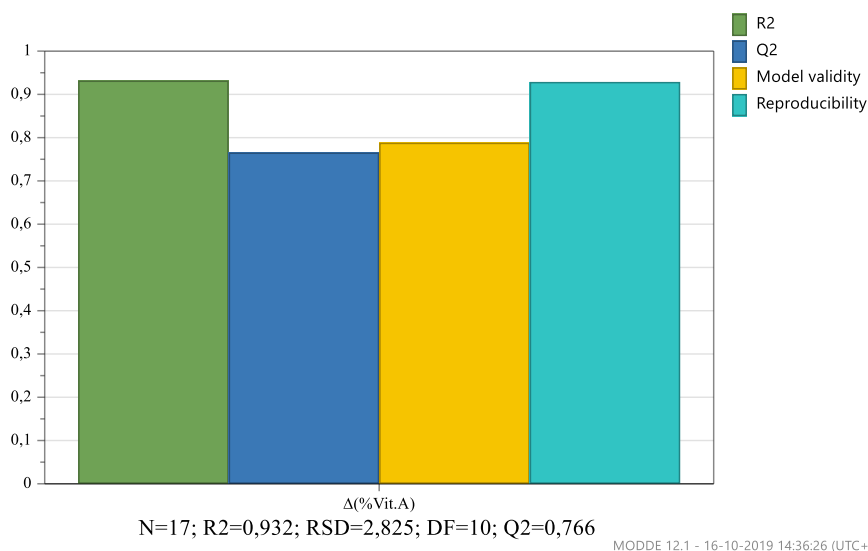


Figura B.6 - Parâmetros de reajuste do modelo MLR da variação do teor Vitamina A – 1 mês, 25°C 60%HR

5. Análise e interpretação do modelo

A análise de variância, ver Tabela B.1, indica que o modelo é credível e eficaz pelos seguintes factos:

- O valor da probabilidade no teste de significância da regressão linear é inferior a 0,05 (0,000) pelo que existe uma relação entre os fatores e as respostas capaz de ser descrita por uma regressão linear;
- O valor da probabilidade no teste de *lack of fit* é superior a 0,05 (0,429), o que indica não existir falta de ajuste ao modelo.

Analisando de igual forma os gráficos de resíduos e de valores observados em função dos previstos, Figura B.7 e Figura B.8, verifica-se que não existem *outliers* e que existe linearidade entre os valores observados e previstos, uma vez que os pontos se encontram junto à reta.

Tabela B.1 - Análise de variância (ANOVA) do modelo da variação do teor Vitamina A – 1 mês, 25°C 60%HR

| Δ (%Vit.A) | Graus de liberdade (g.l) | Soma dos quadrados (SS) | MS (SS/g.l) | F | Probabilidade (p) | Desvio Padrão |
|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|-------------|-------|-------------------|---------------|
| Total | 17 | 1201,85 | 70,70 | | | |
| Constante | 1 | 28,21 | 28,21 | | | |
| Total corrigido | 16 | 1173,64 | 73,35 | | | 8,56 |
| Regressão | 6 | 1093,81 | 182,30 | 22,84 | 0,000 | 13,502 |
| Residual | 10 | 79,82 | 7,98 | | | 2,83 |
| Lack of fit | 8 | 69,38 | 8,67 | 1,66 | 0,429 | 2,94 |
| (Erro de modelo) | | | | | | |
| Erro puro | 2 | 10,44 | 5,22 | | | 2,29 |
| (Erro dos replicados) | | | | | | |
| | N = 17 | Q ² = 0,766 | | | | |
| | g.l = 10 | R ² = 0,932 | RSD = 2,825 | | | |
| | | R ² ajustado = 0,891 | | | | |

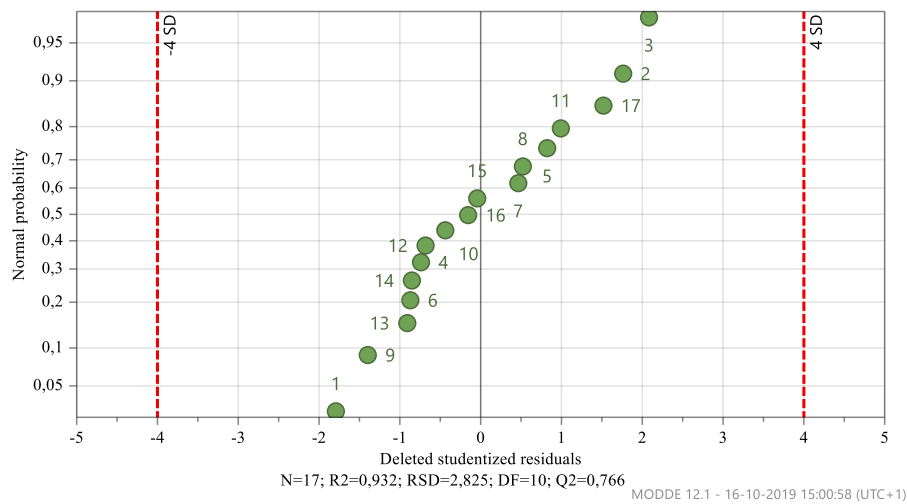


Figura B.7 - Gráfico de resíduos depois do reajuste do modelo da variação do teor Vitamina A – 1 mês, 25°C 60%HR

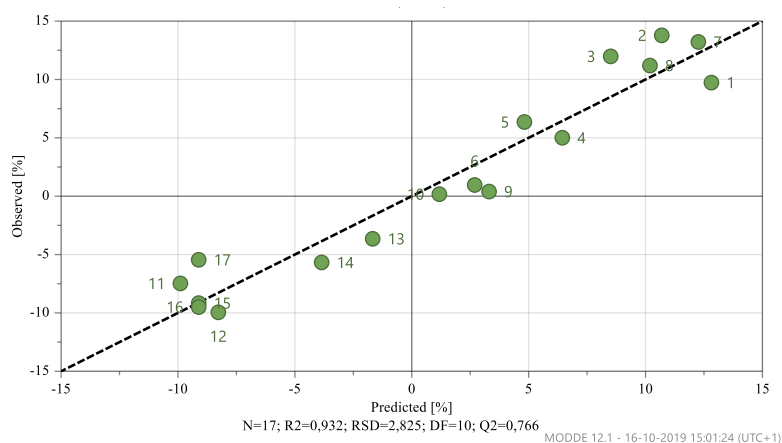


Figura B.8 - Gráfico de valores observados em função dos previstos depois do reajuste do modelo da variação do teor Vitamina A - 1 mês, 25°C 60%HR

Modelo da variação do teor de vitamina A em 1 mês, armazenado a 40°C e 75%HR – Modelação do tipo MLR

A *worksheet* de fatores e respostas deste modelo corresponde à Tabela 4.4, com as respostas da variação de vitamina A após 1 mês a entrarem para este modelo.

1. Tipo de modelação: MLR

2. Parâmetros de ajuste iniciais do modelo

A Figura B.9 esquematiza os parâmetros iniciais do modelo da variação do teor de vitamina A após 1 mês, com as amostras armazenadas a 40°C e 75% HR. É possível verificar um bom valor de R^2 (superior a 0,8), um valor de Q^2 não aceitável (inferior a 0,60), uma validade do modelo superior a 0,25, e um bom valor de reprodutibilidade do ponto central (perto de 1). Com isto, o modelo necessita de ser reajustado de modo a aumentar a sua capacidade de previsão.

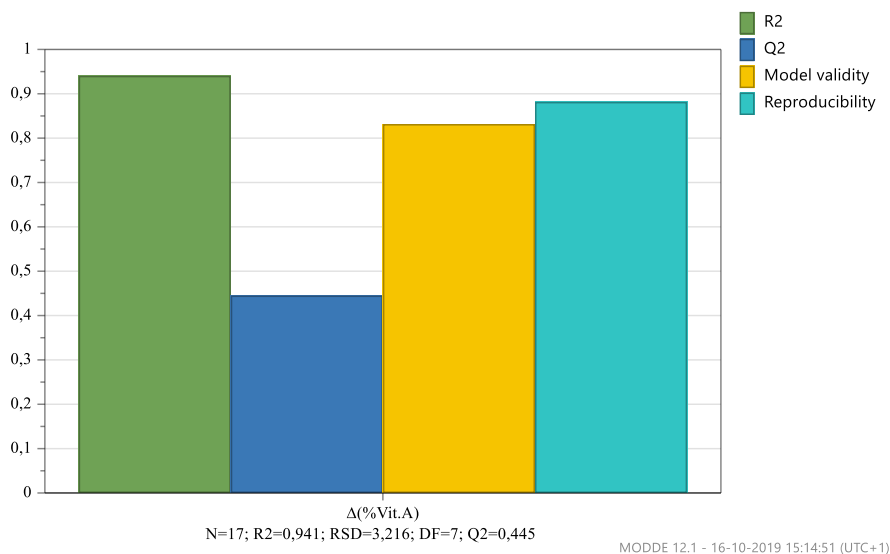


Figura B.9 - Parâmetros de ajuste iniciais do modelo MLR da variação do teor Vitamina A – 1 mês, 40°C 75%HR

3. Reajuste do modelo

Os gráficos de resíduos e de valores observados em função dos previstos, Figura B.10 e Figura B.11, indicam que não existem *outliers* no modelo, pelo que se prosseguiu para a análise de fatores e interações não significativas Figura B.12.

Ao retirar os coeficientes cujos efeitos produzidos são inferiores ao intervalo de confiança de 95% - não significativos – concluiu-se que os fatores significativos para a variação do teor de vitamina A após 1 mês a 40°C e 75% HR seriam as interações cloreto de cálcio*cloreto de cálcio, vitamina E*vitamina E e BHT*Vitamina E. Os fatores cloreto de cálcio, vitamina E e BHT apesar de não serem estatisticamente significativos, têm de ser mantidos no modelo porque os coeficientes significativos estão associados a interações destes três fatores, ver Figura B.13.

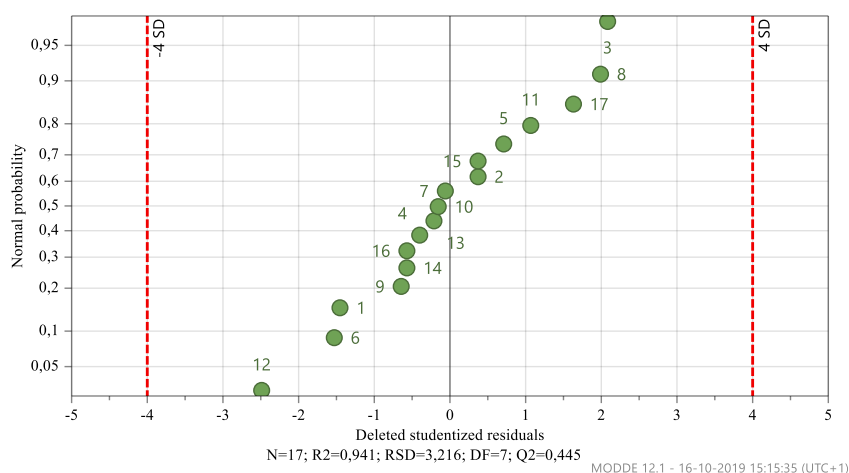


Figura B.10 - Gráficos de resíduos do modelo MLR da variação do teor Vitamina A – 1 mês, 40°C 75%HR

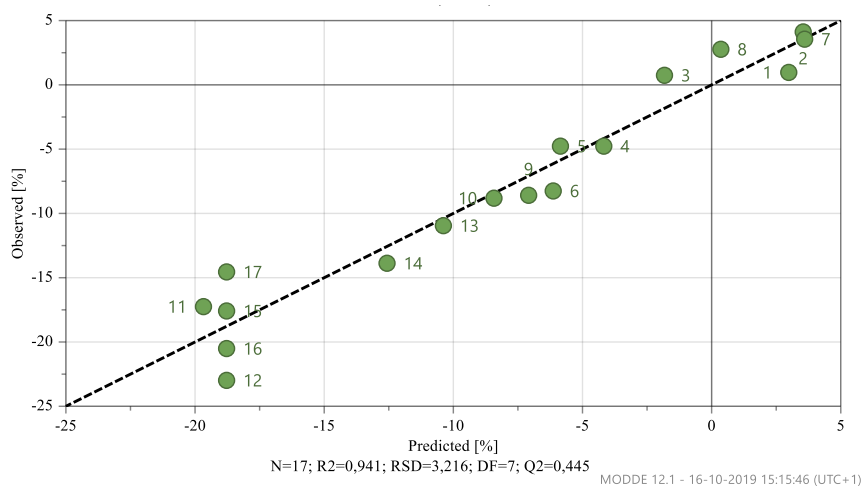


Figura B.11 - Gráfico de valores observados em função dos previstos do modelo MLR da variação do teor Vitamina A - 1 mês, 40°C 75%HR

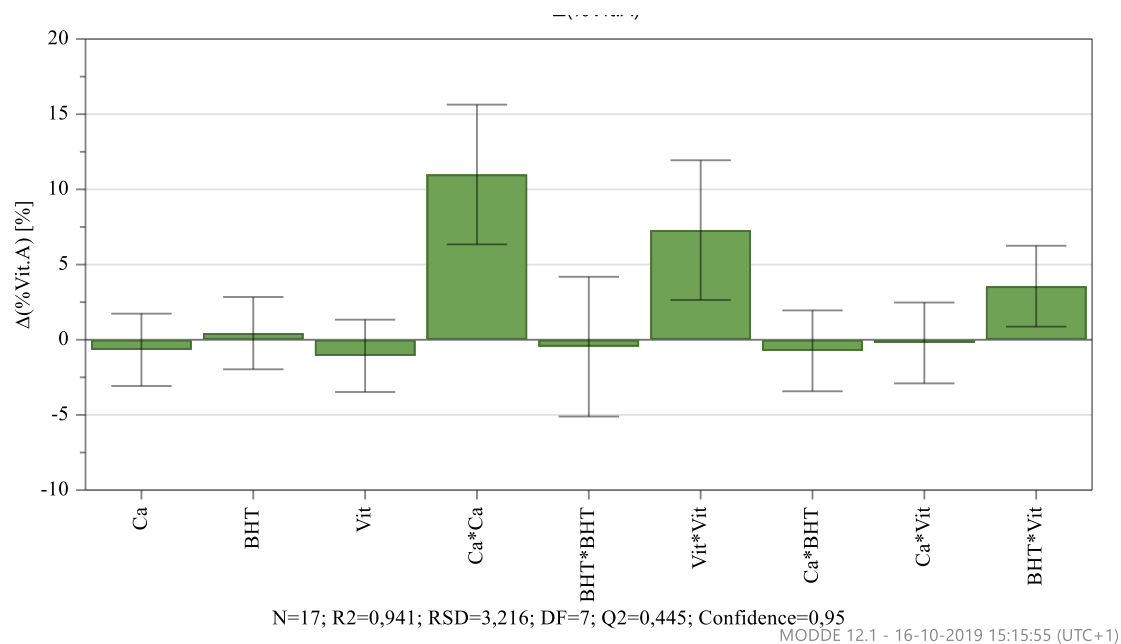


Figura B.12 - Coeficientes iniciais do modelo MLR da variação do teor Vitamina A – 1 mês, 40°C 75%HR

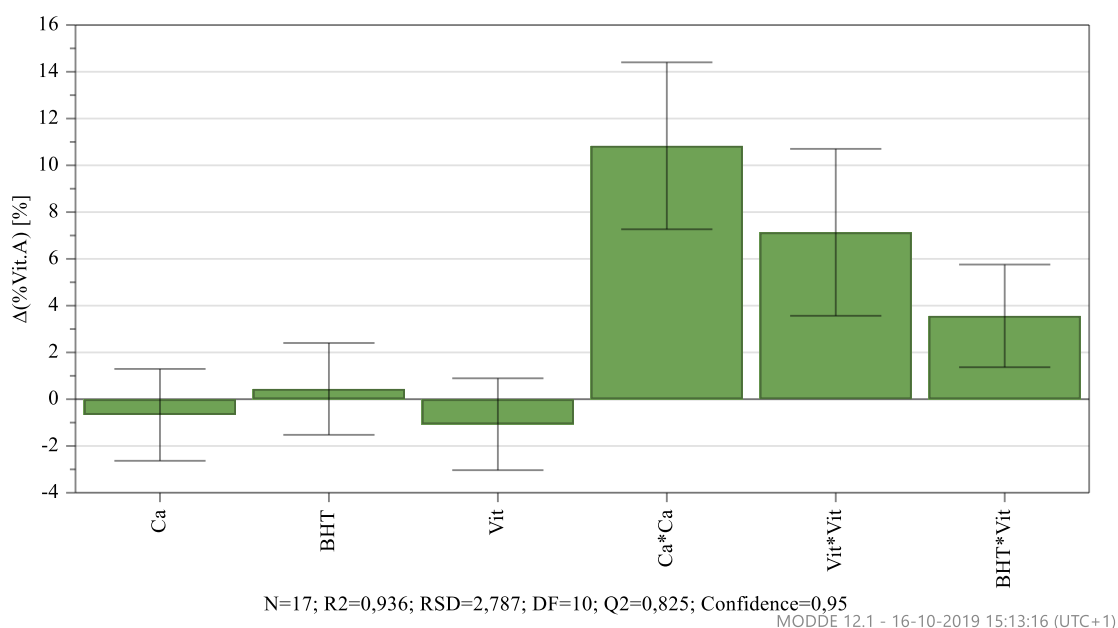


Figura B.13 - Coeficientes finais do modelo MLR da variação do teor Vitamina A – 1 mês, 40°C 75%HR

4. Parâmetros de reajuste do modelo

Depois de reajustado o modelo, o valor de R^2 permaneceu superior a 0,8, Q^2 subiu para valores razoáveis de previsão (superior a 0,6), enquanto que a validade de modelo permaneceu superior a 0,25, obtendo assim um modelo adequado, ver Figura B.14.

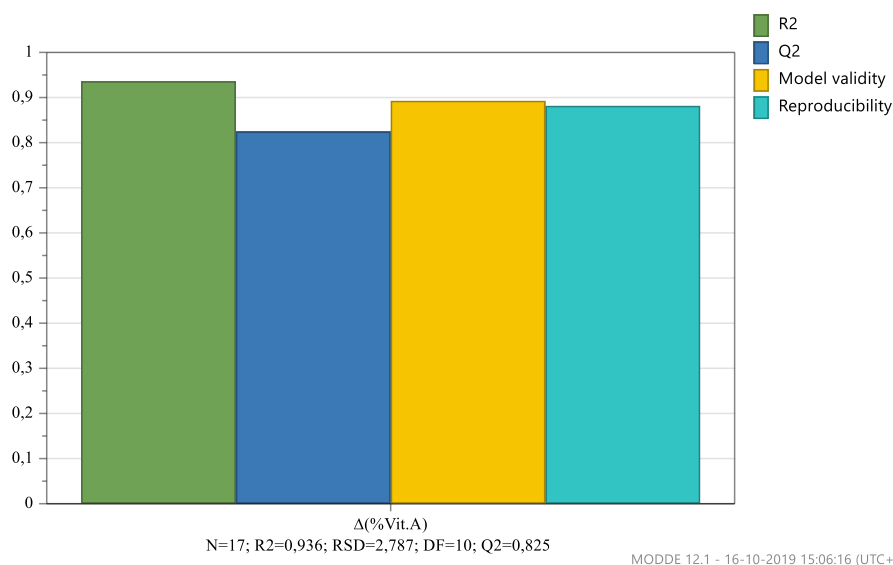


Figura B.14 - Parâmetros de reajuste do modelo MLR da variação do teor Vitamina A - 1 mês, 40°C 75% HR

5. Análise e interpretação do modelo

A análise de variância, ver Tabela B.2, indica que o modelo é credível e eficaz pelos seguintes factos:

- O valor da probabilidade no teste de significância da regressão linear é inferior a 0,05 (0,000) pelo que existe uma relação entre os fatores e as respostas capaz de ser descrita por uma regressão linear;
- O valor da probabilidade no teste de *lack of fit* é superior a 0,05 (0,652), o que indica não existir falta de ajuste ao modelo.

Analisando de igual forma os gráficos de resíduos e de valores observados em função dos previstos, Figura B.15 e Figura B.16, verifica-se que não existem *outliers* e que existe linearidade entre os valores observados e previstos, uma vez que os pontos se encontram junto à reta.

Tabela B.2 - Análise de variância (ANOVA) do modelo da variação do teor Vitamina A – 1 mês, 40°C 75% HR

| Δ (%Vit.A) | Graus de liberdade (g.l) | Soma dos quadrados (SS) | MS (SS/g.l) | F | Probabilidade (p) | Desvio Padrão |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------|-------|-------------------|---------------|
| Total | 17 | 2383,68 | 140,22 | | | |
| Constante | 1 | 1166,16 | 1166,16 | | | |
| Total corrigido | 16 | 1217,52 | 76,10 | | | 8,72 |
| Regressão | 6 | 1139,83 | 189,97 | 24,45 | 0,000 | 13,78 |
| Residual | 10 | 77,69 | 7,77 | | | 2,79 |
| Lack of fit | 8 | 59,69 | 7,46 | 0,83 | 0,652 | 2,73 |
| (Erro de modelo) | | | | | | |
| Erro puro | 2 | 18,01 | 9,01 | | | 3,00 |
| (Erro dos replicados) | | | | | | |
| | N = 17 | Q ² = | 0,825 | | | |
| | g.l = 10 | R ² = | 0,936 | RSD = | 2,787 | |

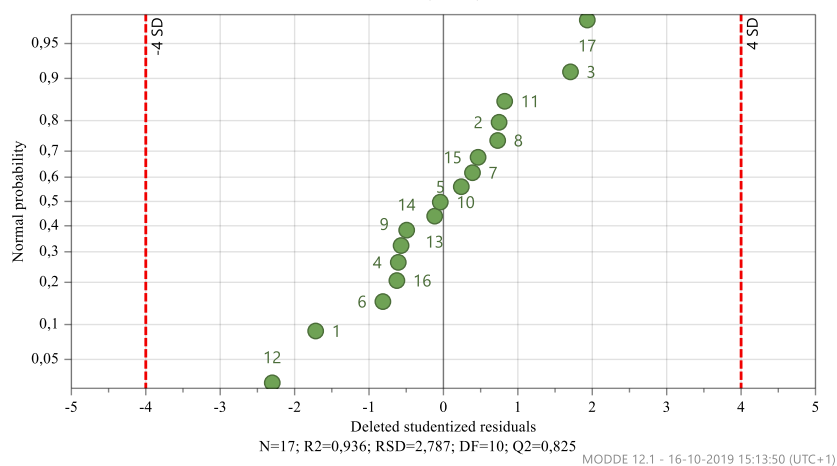


Figura B.15 - Gráficos de resíduos depois do reajuste do modelo MLR da variação do teor Vitamina A – 1 mês, 40°C 75%HR

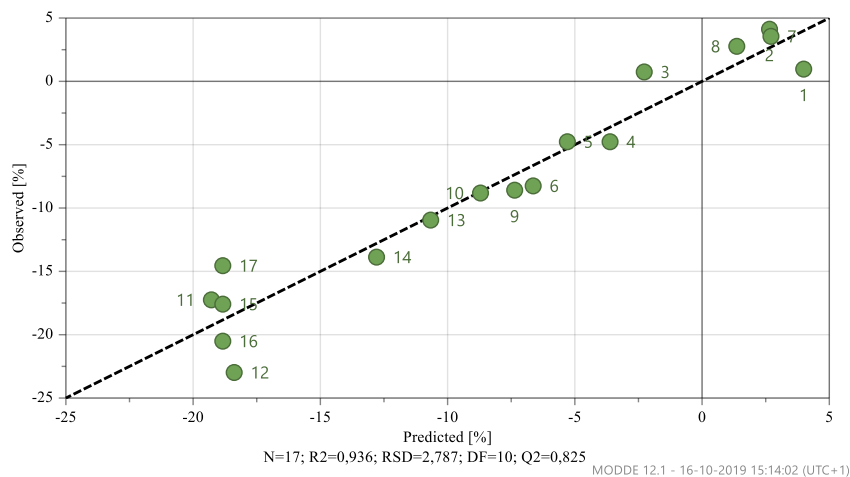


Figura B.16 - Gráfico de valores observados em função dos previstos depois do reajuste do modelo MLR da variação do teor Vitamina A - 1 mês, 40°C 75%HR

Modelo da variação do teor de vitamina A em 3 meses, armazenado a 25°C e 60%HR – Modelação do tipo MLR

A *worksheet* de fatores e respostas deste modelo corresponde à Tabela 4.3, com as respostas da variação de vitamina A após 3 meses a entrarem para este modelo.

1. Tipo de modelação: MLR

2. Parâmetros de ajuste iniciais do modelo

A Figura B.17 esquematiza os parâmetros iniciais do modelo da variação do teor de vitamina A após 3 meses, com as amostras armazenadas a 25°C e 60% HR. É possível verificar um bom valor de R^2 (superior a 0,8), um valor de Q^2 não aceitável (inferior a 0,60) nem de validade do modelo

(inferior a 0,25) e um ótimo valor de reprodutibilidade do ponto central (perto de 1). Com isto, o modelo necessita de ser reajustado.

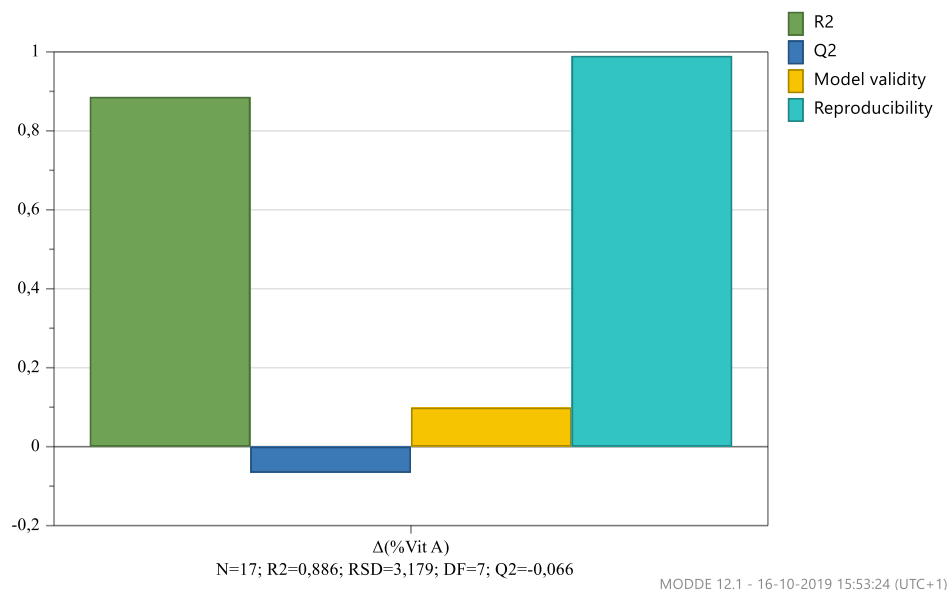


Figura B.17 - Parâmetros de ajuste iniciais do modelo MLR da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 25°C 60%HR

3. Reajuste do modelo

Os gráficos de resíduos e de valores observados em função dos previstos, Figura B.18 e Figura B.19, indicam que não existem *outliers* no modelo, pelo que se prosseguiu para a análise de fatores e interações não significativas, Figura B.20.

Ao retirar os coeficientes cujos efeitos produzidos são inferiores ao intervalo de confiança de 95% - não significativos – concluiu-se que os coeficientes significativos para a variação do teor de vitamina A após 3 meses a 25°C e 60%HR seriam o BHT e a interação cloreto de cálcio*cloreto de cálcio. O fator cloreto de cálcio, apesar de não ser estatisticamente significativo, tem de ser mantido no modelo porque o coeficiente significativo está associado a interações deste fator, ver Figura B.21.

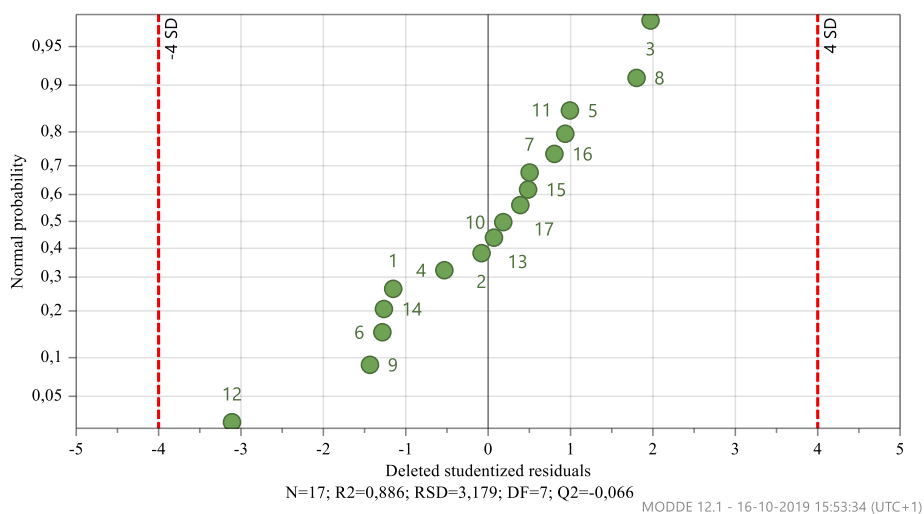


Figura B.18 - Gráficos de resíduos do modelo MLR da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 25°C 60%HR

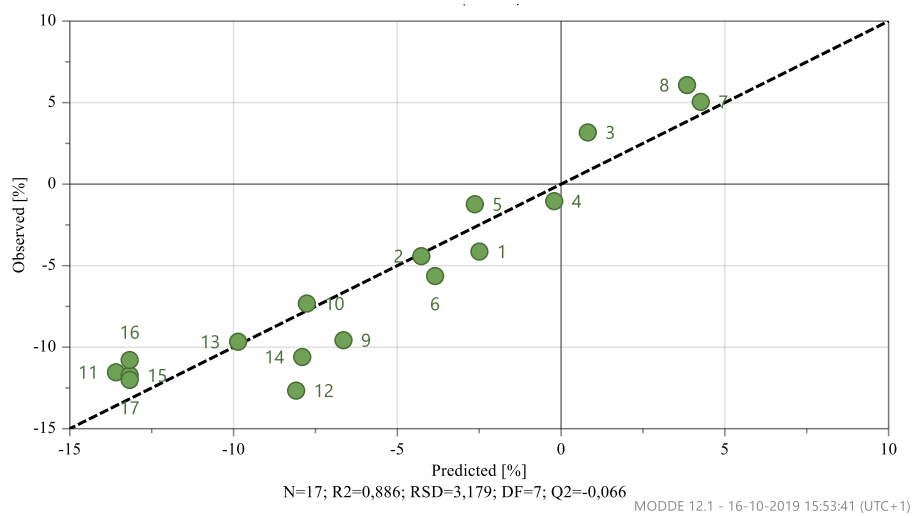


Figura B.19 - Gráfico de valores observados em função dos previstos do modelo MLR da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 25°C 60%HR

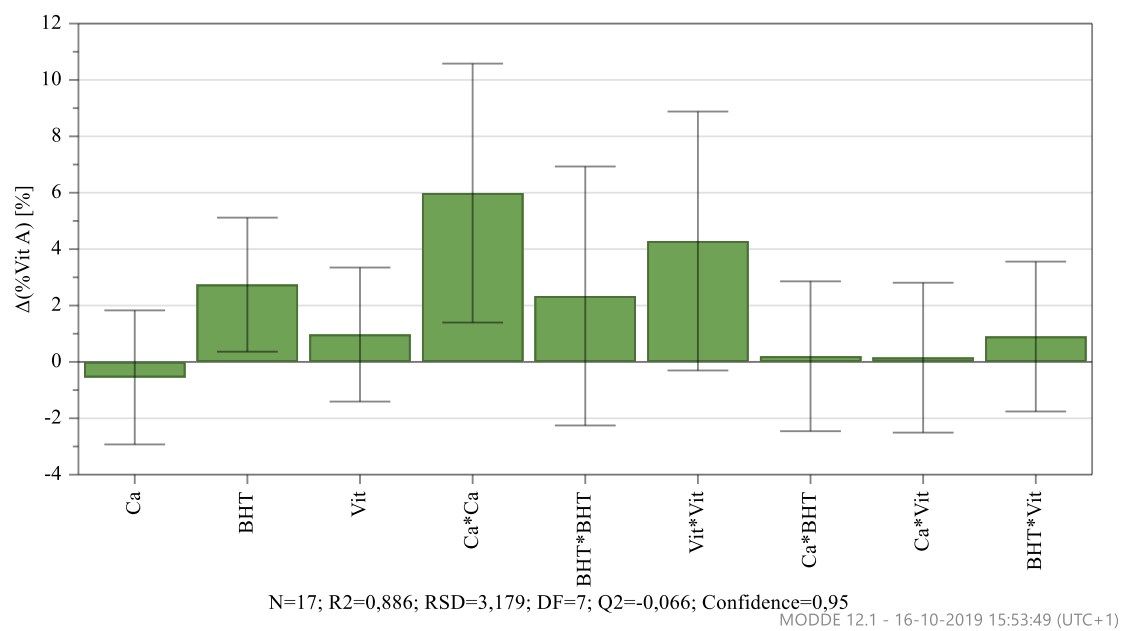


Figura B.20 - Coeficientes iniciais do modelo MLR da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 25°C 60%HR

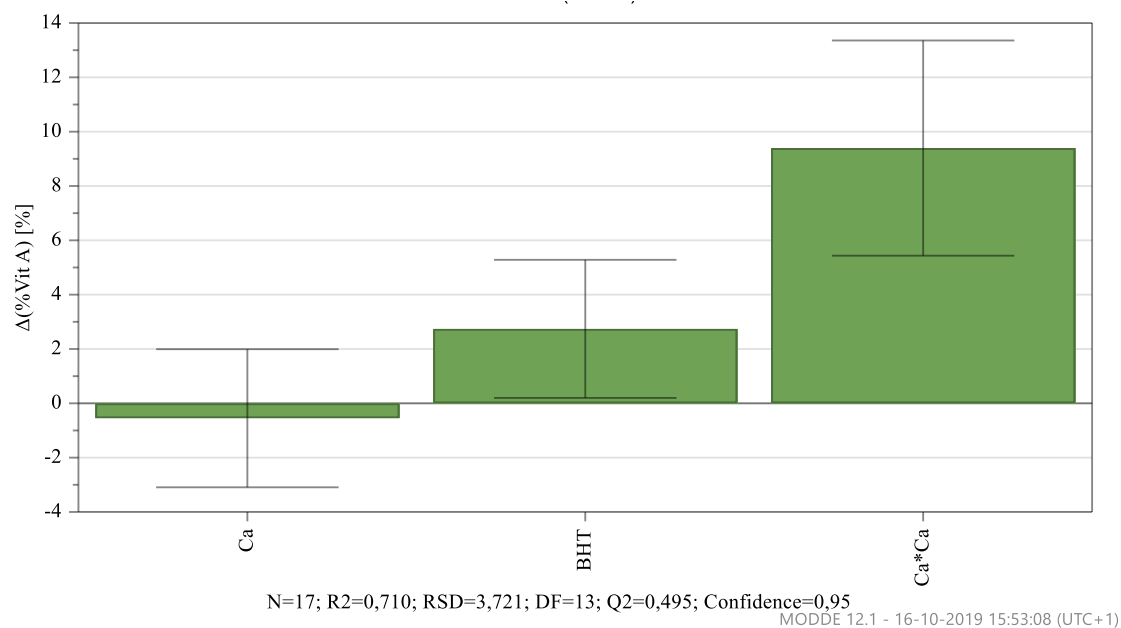


Figura B.21 - Coeficientes finais do modelo MLR da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 25°C 60%HR

4. Parâmetros de reajuste do modelo

Depois de reajustado o modelo, o valor de R^2 permaneceu superior a 0,8, o Q^2 subiu para níveis aceitáveis enquanto que a validade de modelo permaneceu inferior a 0,25, rejeitando a validade do modelo, Figura B.22. Como referido na revisão bibliográfica, isto pode dever-se ao facto da reprodutibilidade do método ser muito boa, mesmo com o parâmetro validade do modelo baixa.

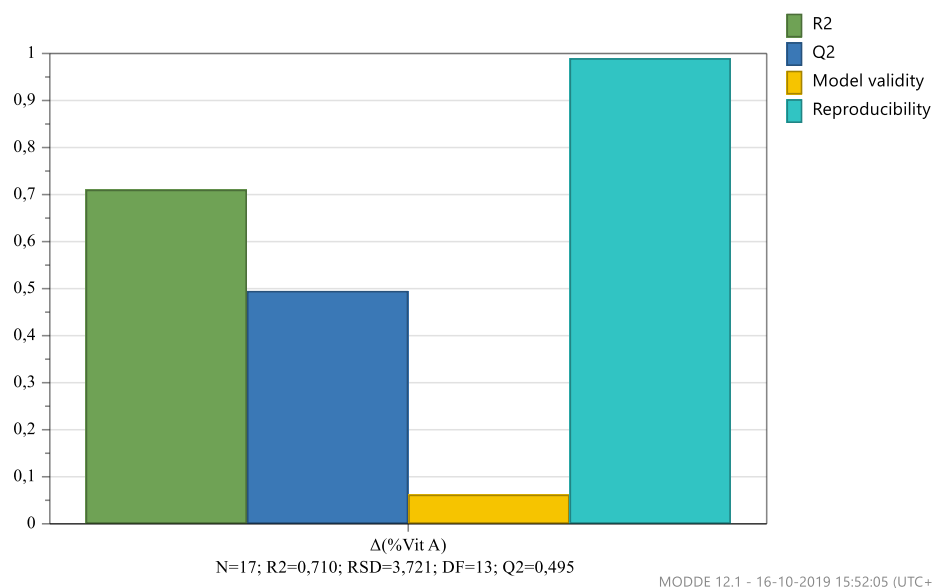


Figura B.22 - Parâmetros de reajuste do modelo MLR da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 25°C 60%HR

5. Análise e interpretação do modelo

A análise de variância, ver Tabela B.3, indica que o modelo não é credível e eficaz pelo facto do valor da probabilidade no teste de *lack of fit* ser inferior a 0,05 (0,024), o que indica existir falta de ajuste ao modelo.

Sendo o parâmetro validade do modelo inferior a 0,25 e o valor da probabilidade de *lack of fit* inferior a 0,05, o modelo é então considerado estatisticamente inválido.

Tabela B.3 - Análise de variância (ANOVA) do modelo da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 25°C 60%HR - MLR

| Δ (%Vit.A) | Graus de liberdade (g.l) | Soma dos quadrados (SS) | MS (SS/g.l) | F | Probabilidade (p) | Desvio Padrão |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------|-------|-------------------|---------------|
| Total | 17 | 1185,39 | 69,73 | | | |
| Constante | 1 | 563,79 | 563,79 | | | |
| Total corrigido | 16 | 621,60 | 38,85 | | | 6,23 |
| Regressão | 3 | 441,60 | 147,20 | 10,63 | 0,001 | 12,13 |
| Residual | 13 | 179,99 | 13,84 | | | 3,72 |
| Lack of fit | 11 | 179,21 | 16,29 | 41,77 | 0,024 | 4,04 |
| (Erro de modelo) | | | | | | |
| Erro puro | 2 | 0,78 | 0,39 | | | 0,62 |
| (Erro dos replicados) | | | | | | |
| | N = 17 | Q ² = | 0,495 | | | |
| | g.l = 13 | R ² = | 0,710 | RSD = | 3,721 | |

Modelo da variação do teor de vitamina A em 3 meses, armazenado a 25°C e 60%HR – Modelação do tipo PLS

A *worksheet* de fatores e respostas deste modelo corresponde à Tabela 4.3, com as respostas da variação de vitamina A após 3 meses a entrarem para este modelo.

1. Tipo de modelação: PLS
2. Parâmetros de ajuste iniciais do modelo

A Figura B.23 esquematiza os parâmetros iniciais do modelo da variação do teor de vitamina A após 3 meses, com as amostras armazenadas a 25°C e 60% HR. É possível verificar um bom valor de R² (superior a 0,8), um valor de Q² no limite do aceitável (0,594) e um ótimo valor de reprodutibilidade do ponto central (perto de 1). Apesar disto, a validade do modelo apresenta um valor inferior a 0,25, indicando que o modelo necessita de ser ajustado.

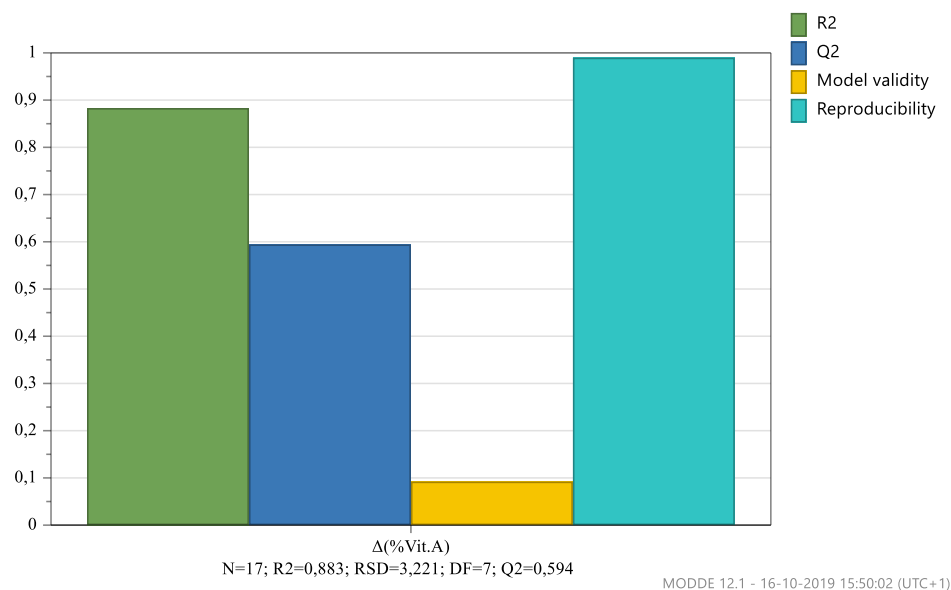


Figura B.23 - Parâmetros de ajuste iniciais do modelo PLS da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 25°C 60%HR

3. Reajuste do modelo

Os gráficos de resíduos e de valores observados em função dos previstos, Figura B.24 e Figura B.25, indicam que não existem *outliers* no modelo, pelo que se prosseguiu para a análise de fatores e interações não significativas Figura B.26.

Ao retirar os coeficientes cujos efeitos produzidos são inferiores ao intervalo de confiança de 95% - não significativos – concluiu-se que os coeficientes significativos para a variação do teor de vitamina A após 3 meses a 25°C e 60%HR seriam o BHT e a interação cloreto de cálcio*cloreto de cálcio. O fator cloreto de cálcio, apesar de não ser estatisticamente significativo, tem de ser mantido no modelo porque o coeficiente significativo está associado a interações deste fator, ver Figura B.27.

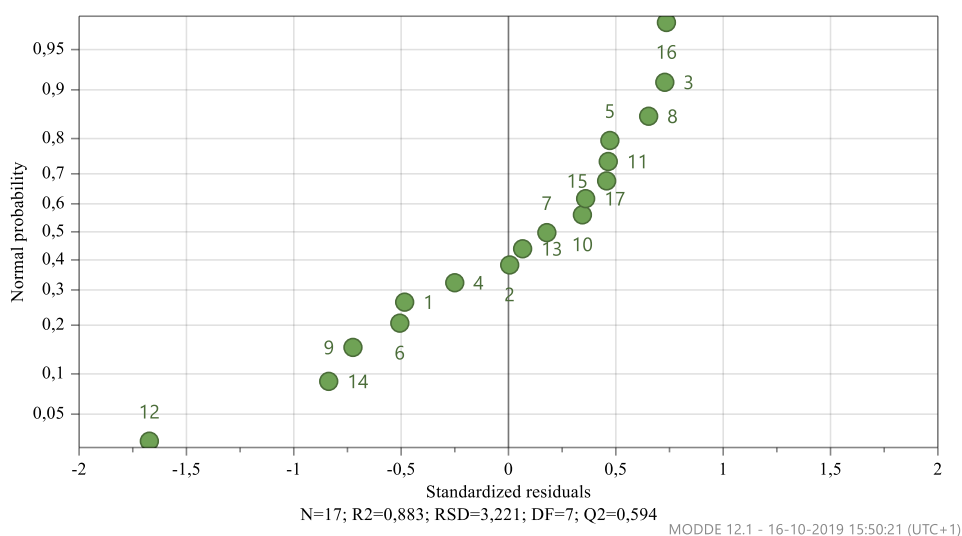


Figura B.24 - Gráfico de resíduos do modelo PLS da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 25°C 60%HR

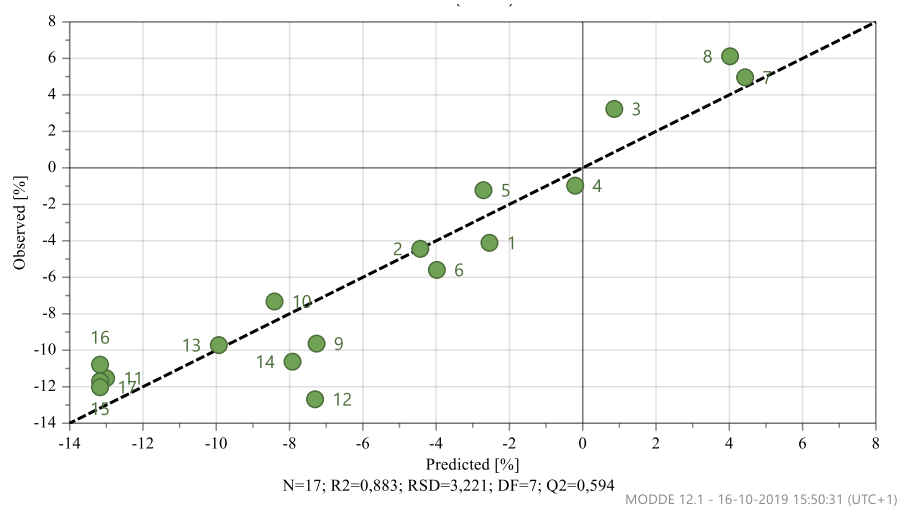


Figura B.25 - Gráfico de valores observados em função dos previstos do modelo PLS da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 25°C 60%HR

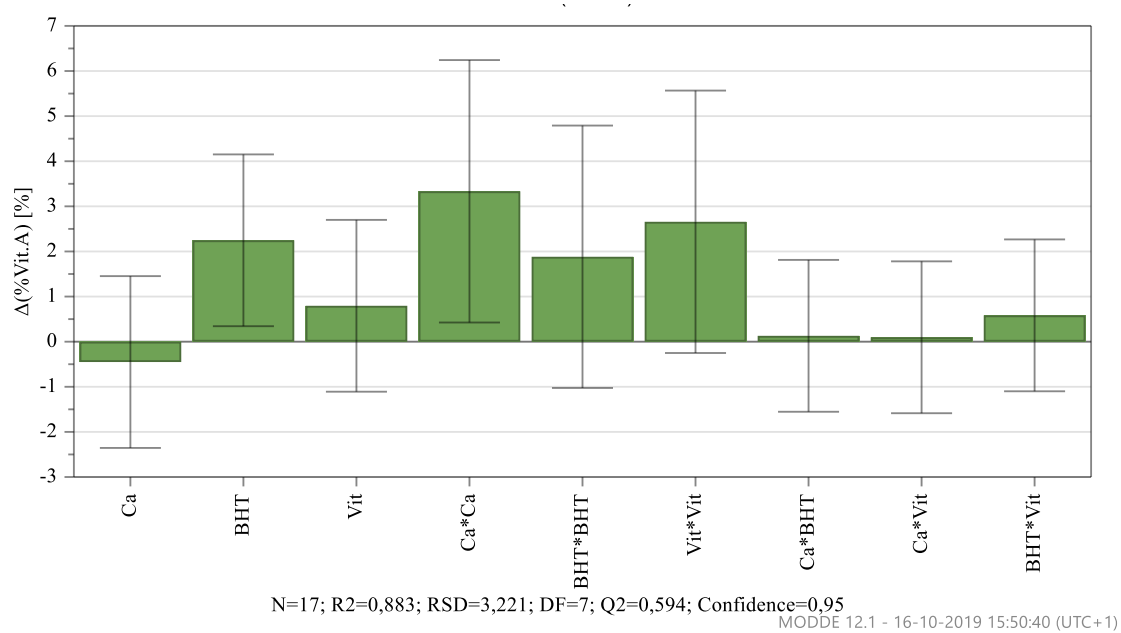


Figura B.26 - Coeficientes iniciais do modelo PLS da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 25°C 60%HR

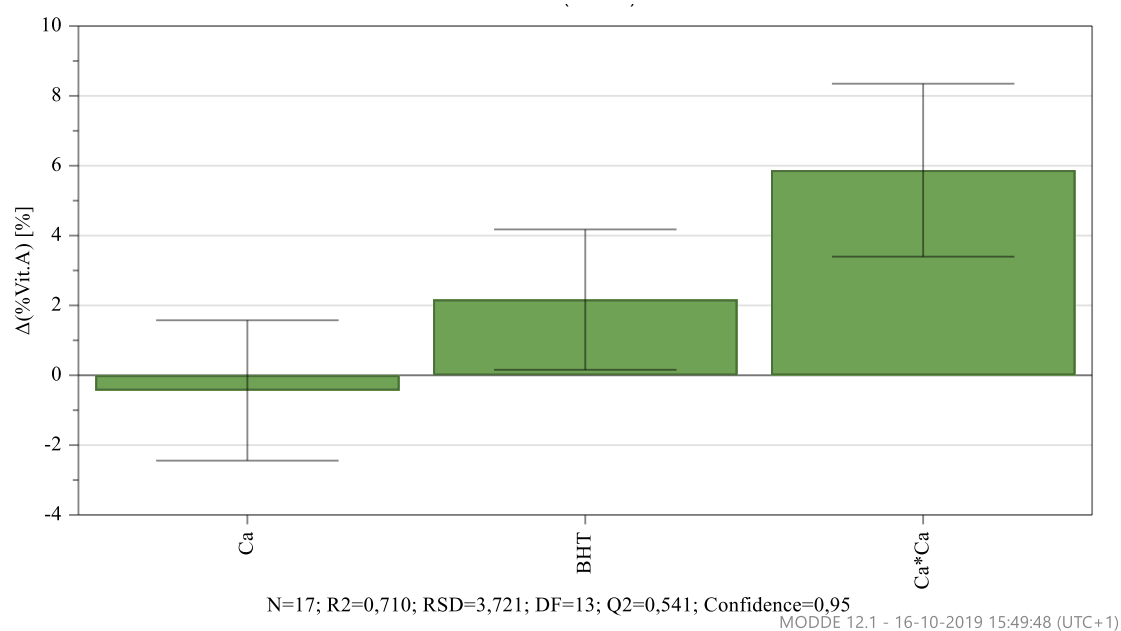


Figura B.27 - Coeficiente finais do modelo PLS da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 25°C 60%HR

4. Parâmetros de reajuste do modelo

Depois de reajustado o modelo, os valores de R^2 e Q^2 diminuíram para 0,710 e 0,541, respectivamente, enquanto que a validade de modelo permaneceu inferior a 0,25, indicando assim uma alta probabilidade de rejeição do modelo, ver Figura B.28.

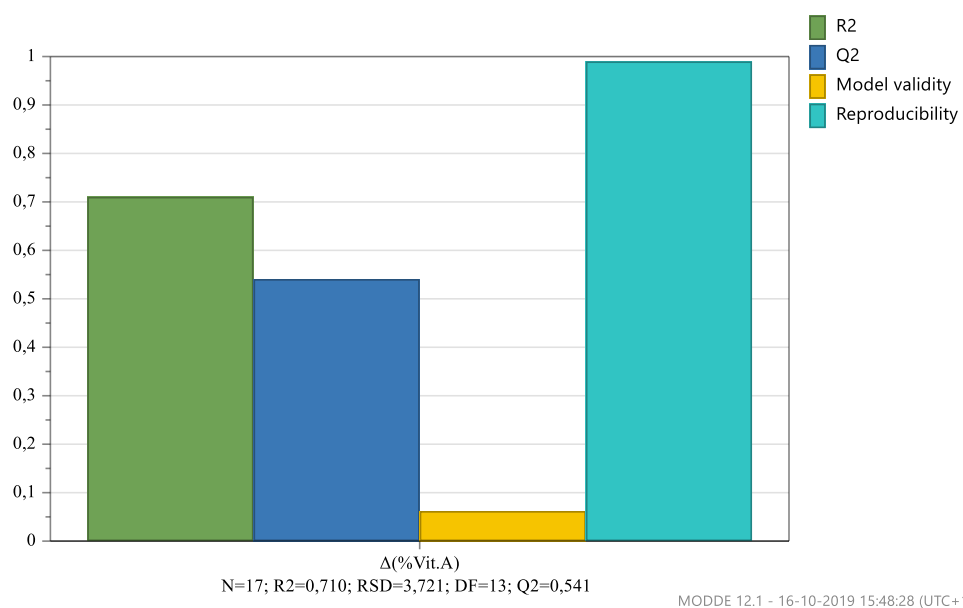


Figura B.28 - Parâmetros de reajuste do modelo PLS da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 25°C 60%HR

5. Análise e interpretação do modelo

A análise de variância, ver Tabela B.4 **Erro! A origem da referência não foi encontrada.**, indica que o modelo não é credível e eficaz pelo facto do valor da probabilidade no teste de *lack of fit* ser inferior a 0,05 (0,024), o que indica existir falta de ajuste ao modelo.

Sendo o parâmetro validade do modelo inferior a 0,25 e o valor da probabilidade de *lack of fit* inferior a 0,05, o modelo é então considerado estatisticamente inválido.

Tabela B.4 - Análise de variância (ANOVA) do modelo da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 25°C 60% HR - PLS

| Δ (%Vit.A) | Graus de liberdade (g.l) | Soma dos quadrados (SS) | MS (SS/g.l) | F | Probabilidade (p) | Desvio Padrão |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------|-------|-------------------|---------------|
| Total | 17 | 1185,39 | 69,73 | | | |
| Constante | 1 | 563,79 | 563,79 | | | |
| Total corrigido | 16 | 621,60 | 38,85 | | | 6,23 |
| Regressão | 3 | 441,60 | 147,20 | 10,63 | 0,001 | 12,13 |
| Residual | 13 | 179,99 | 13,84 | | | 3,72 |
| <i>Lack of fit</i> | 11 | 179,21 | 16,29 | 41,77 | 0,024 | 4,04 |
| (Erro de modelo) | | | | | | |
| Erro puro | 2 | 0,78 | 0,39 | | | 0,62 |
| (Erro dos replicados) | | | | | | |
| | N = 17 | Q ² = | 0,541 | | | |
| | g.l = 13 | R ² = | 0,710 | RSD = | 3,721 | |

Modelo da variação do teor de vitamina A em 3 meses, armazenado a 40°C e 75%HR – Modelação do tipo MLR

A *worksheet* de fatores e respostas deste modelo corresponde à Tabela 4.4, com as respostas da variação de vitamina A após 3 meses a entrarem para este modelo.

1. Tipo de modelação: MLR

2. Parâmetros de ajuste iniciais do modelo

A Figura B.29 esquematiza os parâmetros iniciais do modelo da variação do teor de vitamina A após 3 meses, com as amostras armazenadas a 40°C e 75% HR. É possível verificar um bom valor de R² (superior a 0,8), um valor de Q² não aceitável (inferior a 0,60), uma validade do modelo superior a 0,25, e um ótimo valor de reprodutibilidade do ponto central (perto de 1). Com isto, o modelo necessita de ser reajustado de modo a aumentar a sua capacidade de previsão.

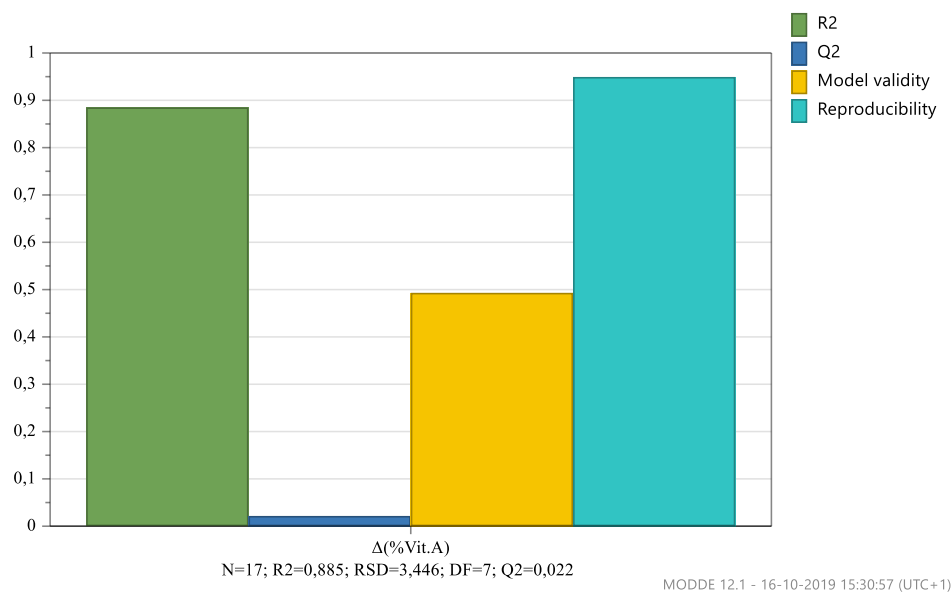


Figura B.29 - Parâmetros de ajuste iniciais do modelo da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 40°C 75%HR

3. Reajuste do modelo

Os gráficos de resíduos e de valores observados em função dos previstos, Figura A.30 e Figura B.31, indicam que não existem *outliers* no modelo, pelo que se prosseguiu para a análise de fatores e interações não significativas Figura B.32.

Ao retirar os coeficientes cujos efeitos produzidos são inferiores ao intervalo de confiança de 95% - não significativos – concluiu-se que os coeficientes significativos para a variação do teor de vitamina A após 3 meses a 40°C e 75% HR seriam as interações cloreto de cálcio*cloreto de cálcio, vitamina E*vitamina E e o fator BHT. Os fatores cloreto de cálcio e vitamina E apesar de não serem estatisticamente significativos, têm de ser mantidos no modelo porque os coeficientes significativos estão associados a interações destes fatores, ver Figura B.33.

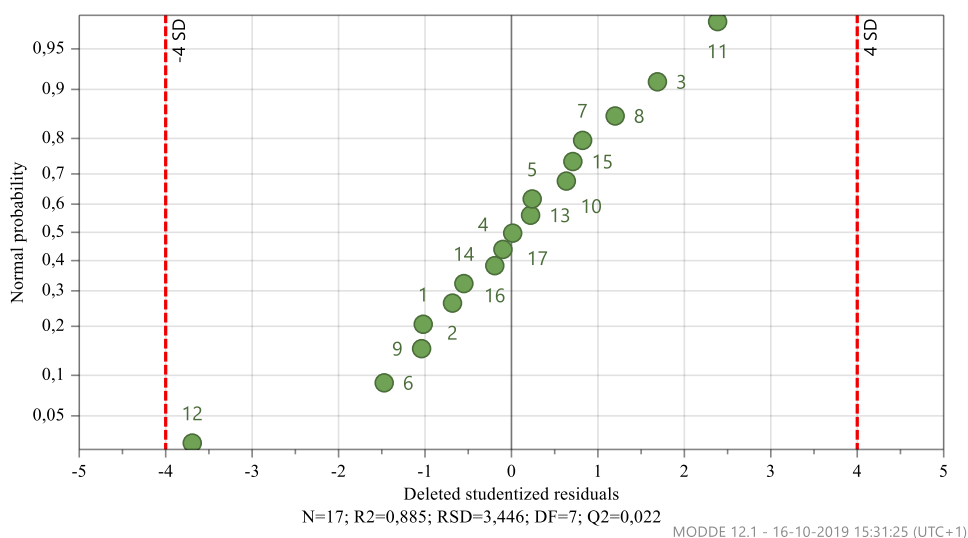


Figura A.30 - Gráfico de resíduos do modelo da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 40°C 75%HR

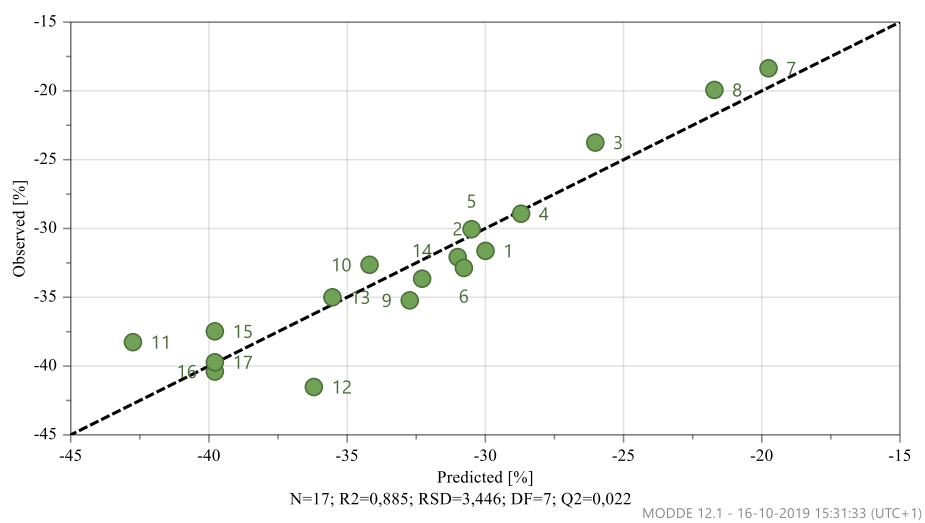


Figura B.31 - Gráfico de valores observados em função dos previstos do modelo da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 40°C 75%HR

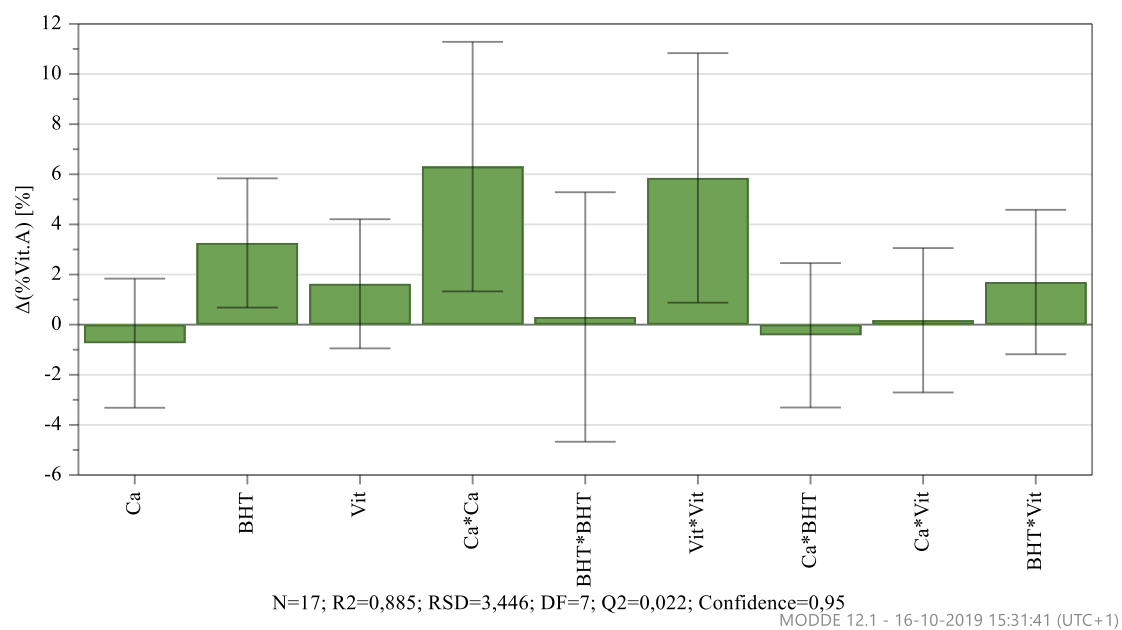


Figura B.32 - Coeficientes iniciais do modelo da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 40°C 75%HR

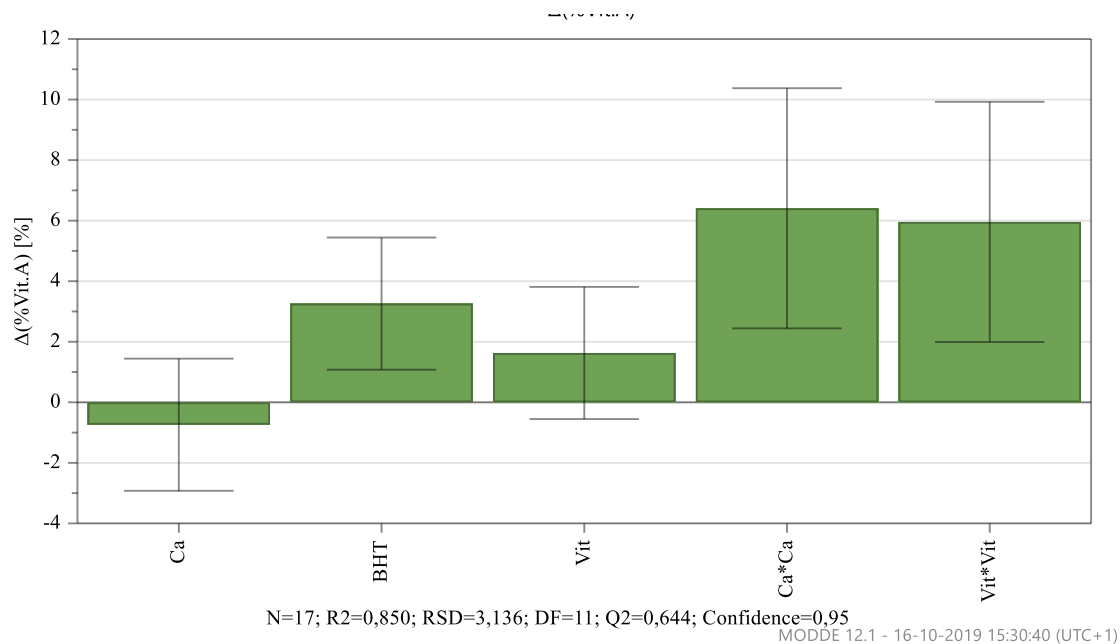


Figura B.33 - Coeficientes finais do modelo da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 40°C 75%HR

4. Parâmetros de reajuste do modelo

Depois de reajustado o modelo, o valor de R^2 permaneceu superior a 0,8, Q^2 subiu para valores razoáveis de previsão (superior a 0,6), enquanto que a validade de modelo permaneceu superior a 0,25, obtendo assim um modelo fidedigno, ver Figura B.34.

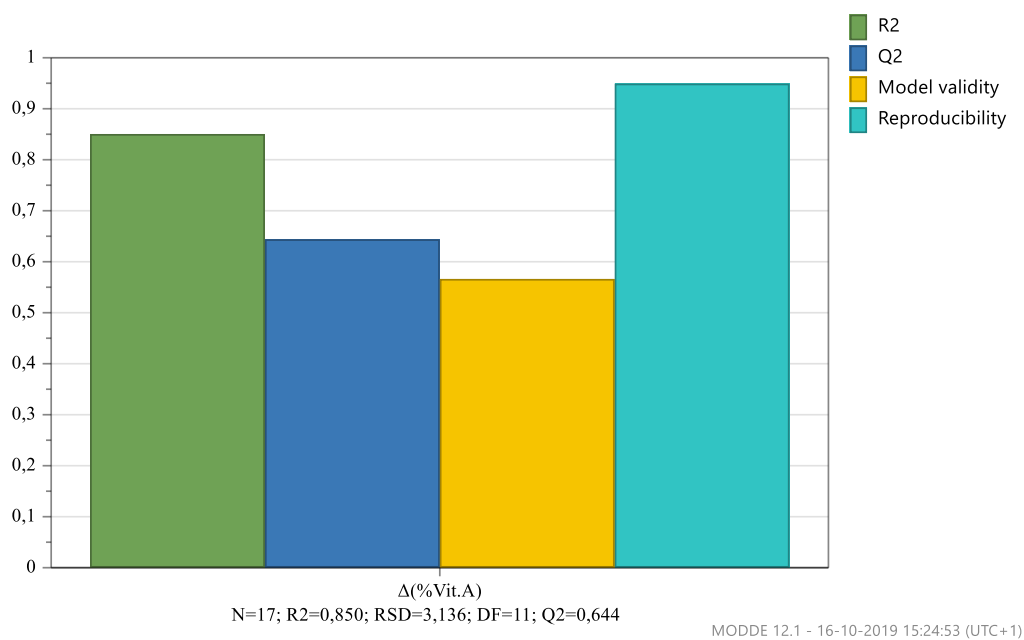


Figura B.34 - Parâmetros de reajuste do modelo da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 40°C 75%HR

5. Análise e interpretação do modelo

A análise de variância, ver Tabela B.5, indica que o modelo é credível e eficaz pelos seguintes factos:

- O valor da probabilidade no teste de significância da regressão linear é inferior a 0,05 (0,000) pelo que existe uma relação entre os fatores e as respostas capaz de ser descrita por uma regressão linear;
- O valor da probabilidade no teste de *lack of fit* é superior a 0,05 (0,177), o que indica não existir falta de ajuste ao modelo.

Analisando de igual forma os gráficos de resíduos e de valores observados em função dos previstos, Figura B.35 e Figura B.36, verifica-se que não existem *outliers* e que existe linearidade entre os valores observados e previstos, uma vez que os pontos se encontram junto à reta.

Tabela B.5 - Análise de variância (ANOVA) do modelo da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 40°C 75%HR

| Δ (%Vit.A) | Graus de liberdade (g.l) | Soma dos quadrados (SS) | MS (SS/g.l) | F | Probabilidade (p) | Desvio Padrão |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------|-------|-------------------|---------------|
| Total | 17 | 18615,00 | 1095,00 | | | |
| Constante | 1 | 17891,30 | 17891,30 | | | |
| Total corrigido | 16 | 723,68 | 45,23 | | | 6,72 |
| Regressão | 5 | 615,49 | 123,09 | 12,51 | 0,000 | 11,09 |
| Residual | 11 | 108,19 | 9,83 | | | 3,13 |
| Lack of fit | 9 | 103,61 | 11,51 | 5,027 | 0,177 | 3,39 |
| (Erro de modelo) | | | | | | |
| Erro puro | 2 | 4,58 | 2,29 | | | 1,51 |
| (Erro dos replicados) | | | | | | |
| | N = 17 | Q ² = | 0,644 | | | |
| | g.l. = 11 | R ² = | 0,850 | RSD = | 3,136 | |

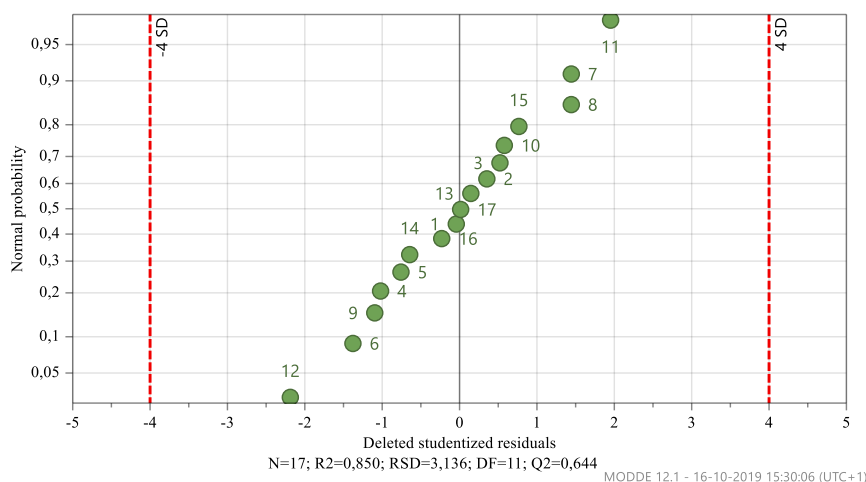


Figura B.35 - Gráfico de resíduos depois do reajuste do modelo da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 40°C 75%HR

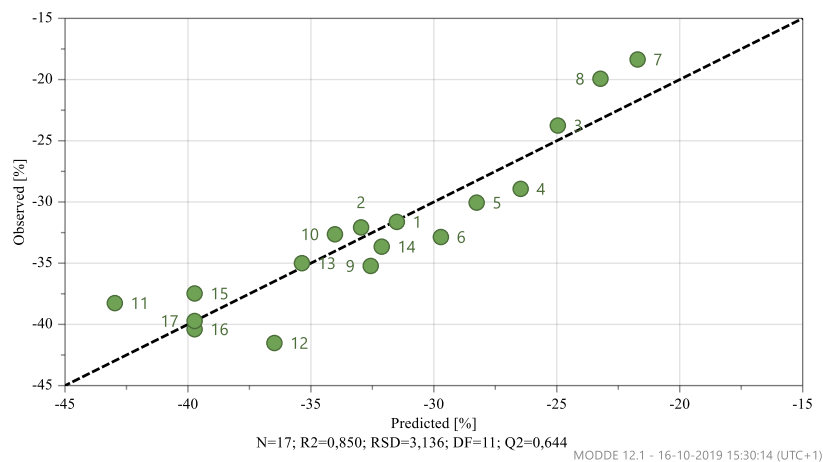


Figura B.36 - Gráfico de valores observados em função dos previstos depois do reajuste do modelo da variação do teor Vitamina A - 3 meses, 40°C 75%HR

Modelo do valor de pH em 3 meses, armazenado a 25°C e 60%HR – Modelação do tipo MLR

A *worksheet* de fatores e respostas deste modelo corresponde à Tabela 4.5, com as respostas da variação de vitamina A após 3 meses a entrarem para este modelo.

1. Tipo de modelação: MLR
2. Parâmetros de ajuste iniciais do modelo

A Figura B.37 esquematiza os parâmetros iniciais do modelo do valor de pH após 3 meses, com as amostras armazenadas a 25°C e 60% HR. É possível verificar um bom valor de R^2 (superior a 0,8), um valor bastante aceitável de Q^2 (superior a 0,60), uma validade do modelo superior a 0,25, e um ótimo valor de reprodutibilidade do ponto central (perto de 1). Apesar dos bons parâmetros, procedeu-se à análise dos coeficientes de modo a identificar eventuais *outliers* e coeficientes não significativos.

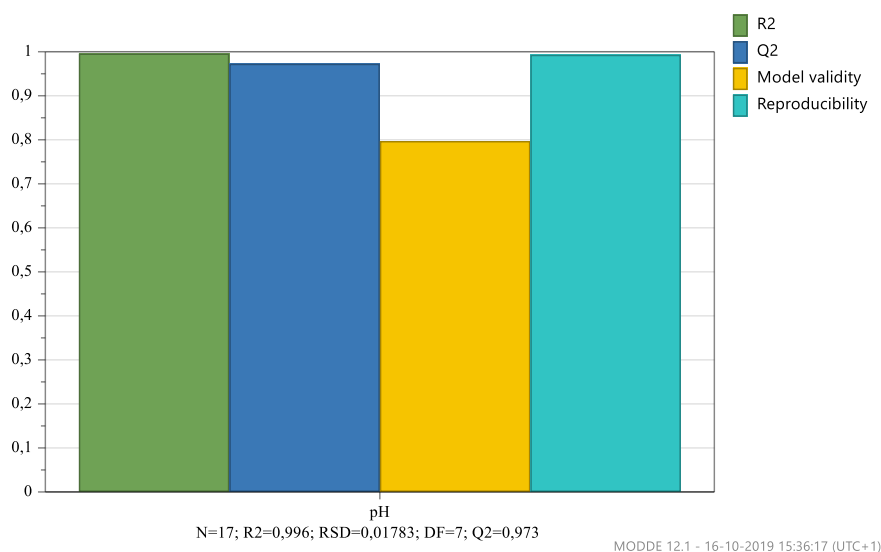


Figura B.37 - Parâmetros de ajuste iniciais do modelo MLR do valor de pH - 3 meses, 25°C 60%HR

3. Reajuste do modelo

Os gráficos de resíduos e de valores observados em função dos previstos, Figura B.38 e Figura B.39, indicam que não existem *outliers* no modelo, pelo que se prosseguiu para a análise de fatores e interações não significativas, Figura B.40.

Ao retirar os coeficientes cujos efeitos produzidos são inferiores ao intervalo de confiança de 95% - não significativos – concluiu-se que os coeficientes significativos para o modelo do valor de pH após 3 meses a 25°C e 60% HR seriam o cloreto de cálcio e a interação BHT*BHT. O BHT apesar de não ser estatisticamente significativo, tem de ser mantido no modelo porque está associado a uma interação marginalmente significativa, ver Figura B.41.

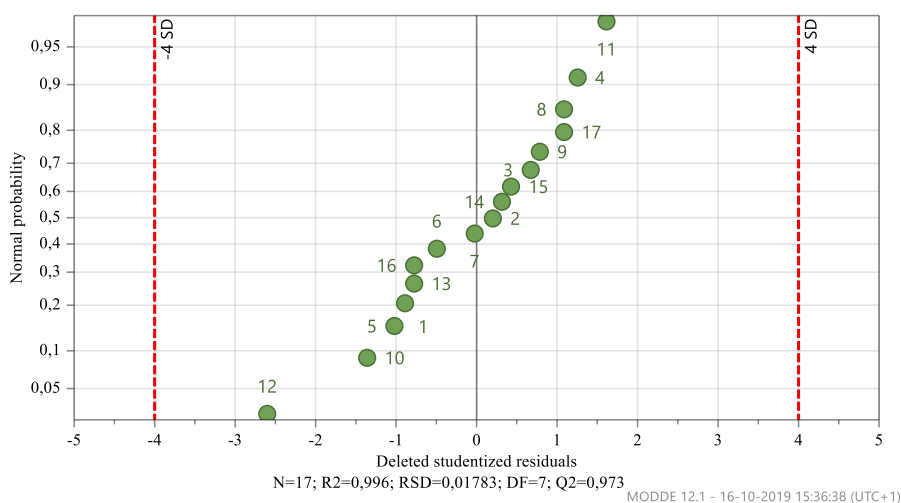


Figura B.38 - Gráficos de resíduos do modelo MLR do valor de pH - 3 meses, 25°C 60%HR

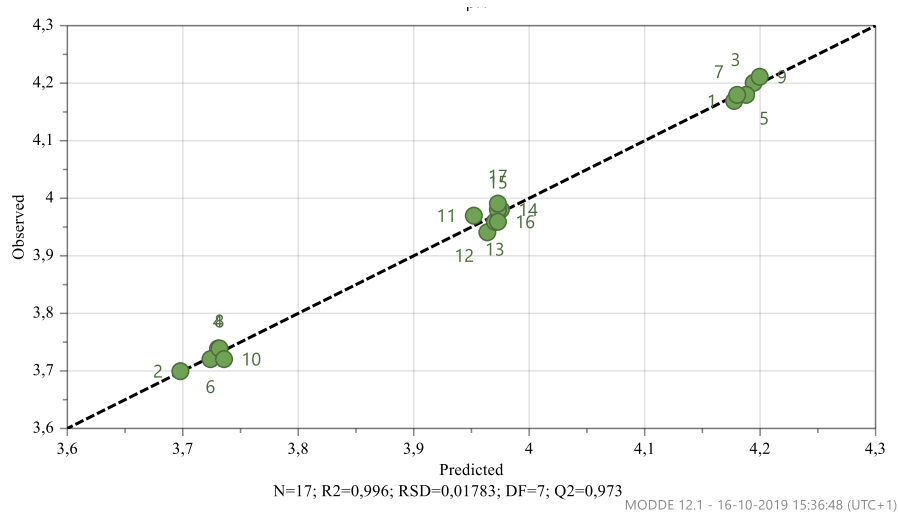


Figura B.39 - Gráfico de valores observados em função dos previstos do modelo MLR do valor de pH - 3 meses, 25°C 60%HR

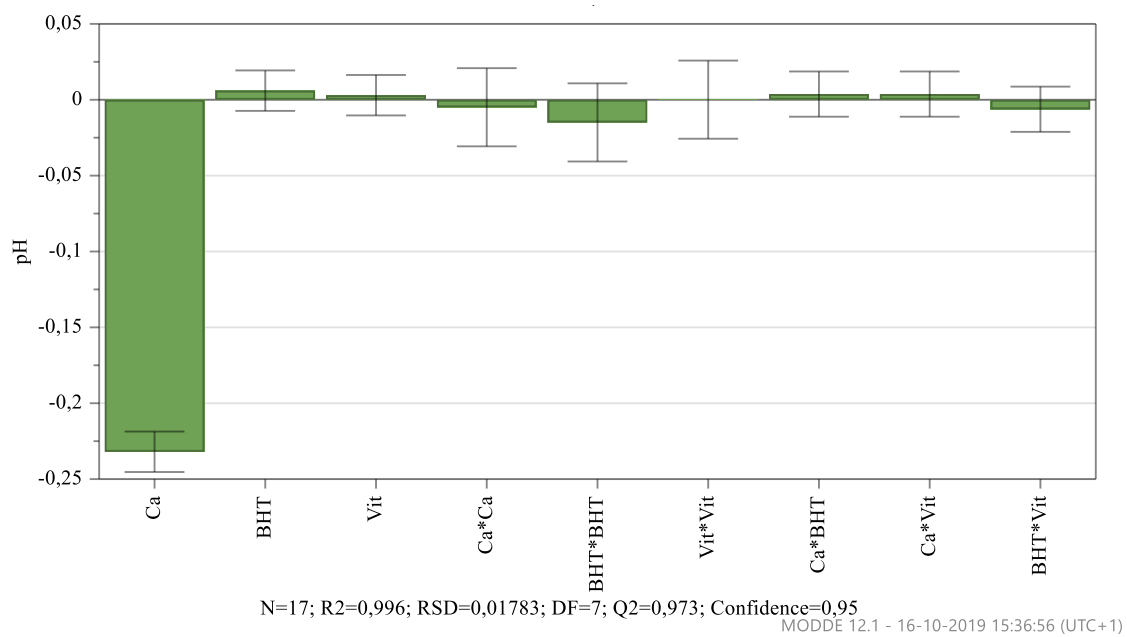


Figura B.40 - Coeficientes iniciais do modelo MLR do valor de pH – 3 meses, 25°C 60%HR

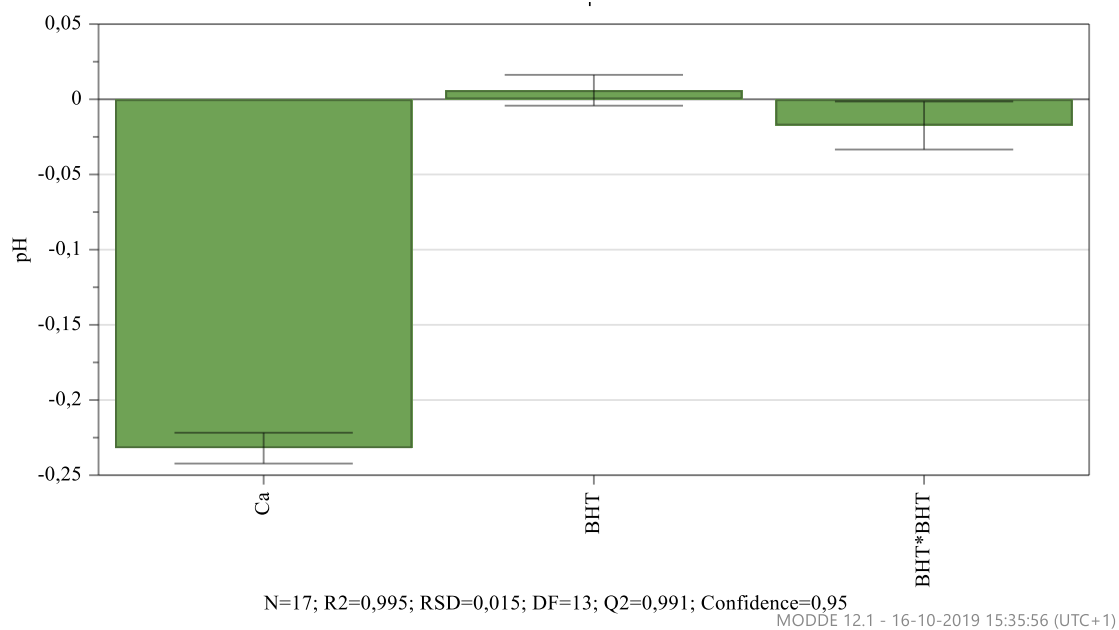


Figura B.41 – Coeficientes finais do modelo MLR do valor de pH – 3 meses, 25°C 60%HR

4. Parâmetros de reajuste do modelo

Depois de reajustado o modelo, todos os parâmetros permaneceram com valores bastante aceitáveis, continuando com um modelo válido, ver Figura B.42.

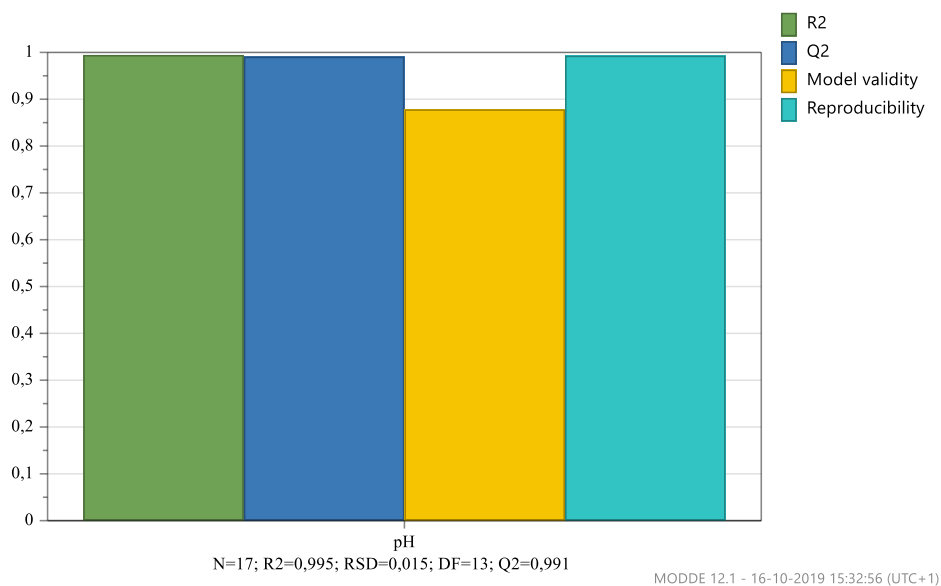


Figura B.42 - Parâmetros de reajuste do modelo MLR do valor de pH - 3 meses, 25°C 60%HR

5. Análise e interpretação do modelo

A análise de variância, ver Tabela B.6, indica que o modelo é credível e eficaz pelos seguintes factos:

- O valor da probabilidade no teste de significância da regressão linear é inferior a 0,05 (0,000) pelo que existe uma relação entre os fatores e as respostas capaz de ser descrita por uma regressão linear;
- O valor da probabilidade no teste de *lack of fit* é superior a 0,05 (0,615), o que indica não existir falta de ajuste ao modelo.

Analisando de igual forma os gráficos de resíduos e de valores observados em função dos previstos, Figura B.43 e Figura B.44, verifica-se que não existem *outliers* e que existe linearidade entre os valores observados e previstos, uma vez que os pontos se encontram junto à reta.

Tabela B.6 - Análise de variância (ANOVA) do modelo do valor de pH - 3 meses, 25°C 60%HR

| Δ (%Vit.A) | Graus de liberdade (g.l) | Soma dos quadrados (SS) | MS (SS/g.l) | F | Probabilidade (p) | Desvio Padrão |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------|----------|-------------------|---------------|
| Total | 17 | 267,29 | 15,7228 | | | |
| Constante | 1 | 266,75 | 266,75 | | | |
| Total corrigido | 16 | 0,54 | 0,03 | | | 0,18 |
| Regressão | 3 | 0,53985 | 0,18 | 799,579 | 0,000 | 0,42 |
| Residual | 13 | 0,003 | 0,00022 | | | 0,02 |
| Lack of fit | 11 | 0,002 | 0,00022 | 0,958078 | 0,615 | 0,02 |
| (Erro de modelo) | | | | | | |
| Erro puro | 2 | 0,0005 | 0,00025 | | | 0,02 |
| (Erro dos replicados) | | | | | | |
| | N = 17 | Q ² = | 0,991 | | | |
| | g.l. = 13 | R ² = | 0,995 | RSD = | 0,015 | |

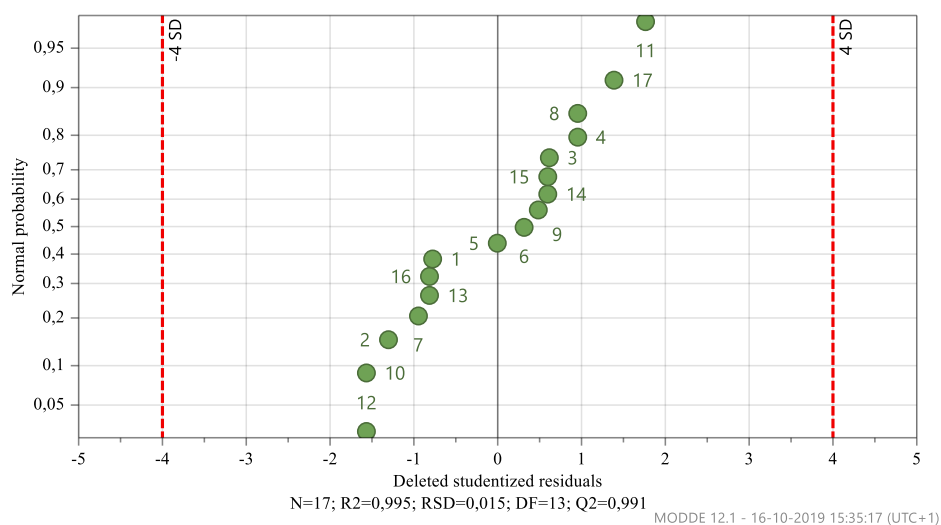


Figura B.43 - Gráficos de resíduos depois do reajuste do modelo MLR do valor de pH - 3 meses, 25°C 60%HR

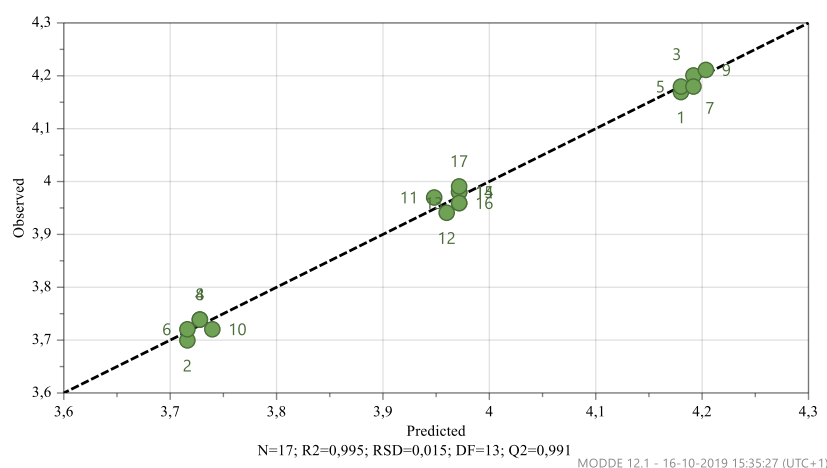


Figura B.44 - Gráfico de valores observados em função dos previstos depois do reajuste do modelo MLR do valor de pH - 3 meses, 25°C 60%HR

Modelo do valor de pH em 3 meses, armazenado a 40°C e 75%HR – Modelação do tipo MLR

A *worksheet* de fatores e respostas deste modelo corresponde à Tabela 4.6, com as respostas da variação de vitamina A após 3 meses a entrarem para este modelo.

1. Tipo de modelação: MLR
2. Parâmetros de ajuste iniciais do modelo

A Figura B.45 esquematiza os parâmetros iniciais do modelo do valor de pH após 3 meses, com as amostras armazenadas a 40°C e 75% HR. É possível verificar um bom valor de R^2 (superior a 0,8), um valor bastante aceitável de Q^2 (superior a 0,60), uma validade do modelo superior a 0,25, e um ótimo valor de reprodutibilidade do ponto central (perto de 1). Apesar do modelo inicial ser satisfatório, procedeu-se à análise deste de modo a identificar eventuais *outliers* e coeficientes não significativos.

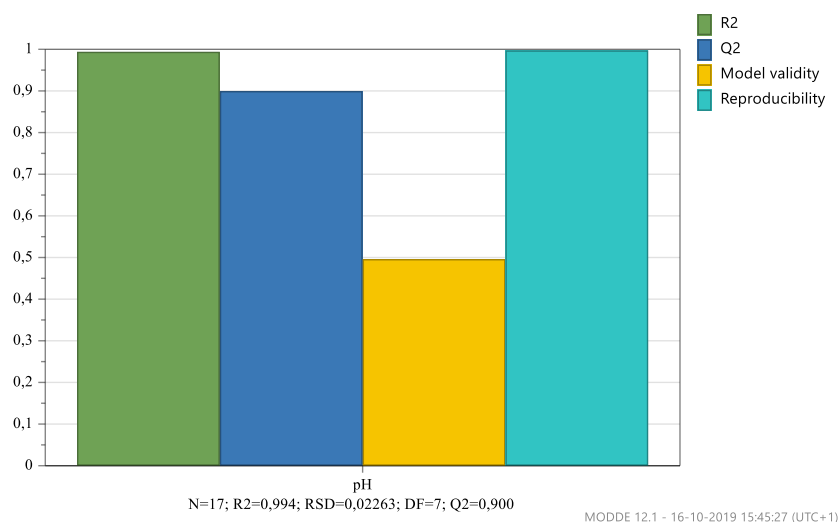


Figura B.45 - Parâmetros de ajuste iniciais do modelo MLR do valor de pH - 3 meses, 40°C 75%HR

3. Reajuste do modelo

Os gráficos de resíduos e de valores observados em função dos previstos, Figura B.46 e Figura B.47, indicam que não existem *outliers* no modelo, pelo que se prosseguiu para a análise de fatores e interações não significativas, Figura B.48.

Ao retirar os coeficientes cujos efeitos produzidos são inferiores ao intervalo de confiança de 95% - não significativos – surgiu a presença de um *outlier*, correspondente à experiência 6, que acabou por ser retirado e concluiu-se que o coeficiente significativo para o modelo do valor de pH após 3 meses a 40°C e 75% HR seria o cloreto de cálcio, ver Figura B.49.

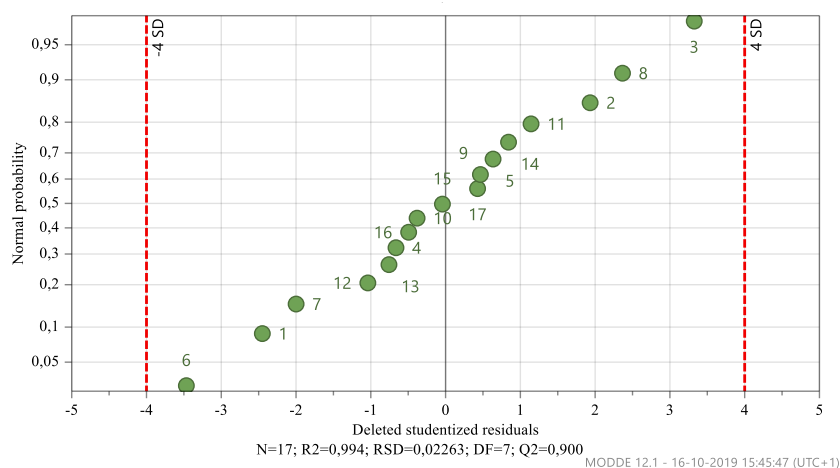


Figura B.46 - Gráficos de resíduos do modelo MLR do valor de pH - 3 meses, 40°C 75%HR

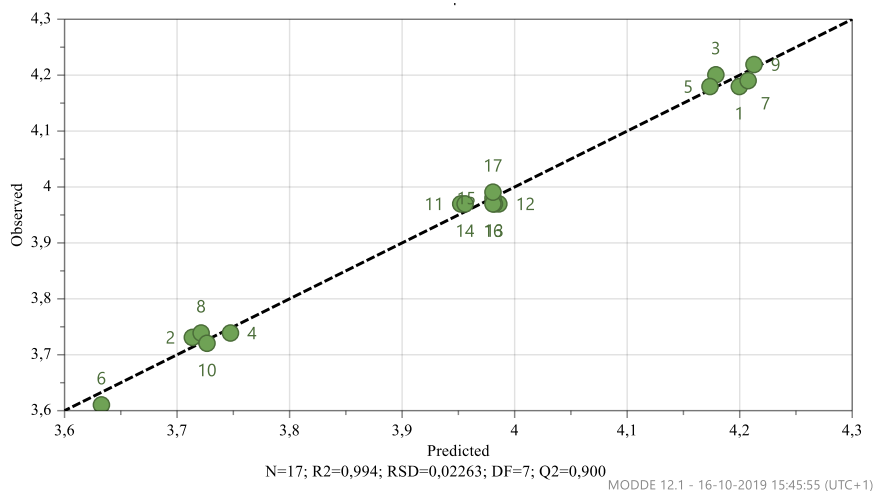


Figura B.47 - Gráfico de valores observados em função dos previstos do modelo MLR do valor de pH - 3 meses, 40°C 75%HR

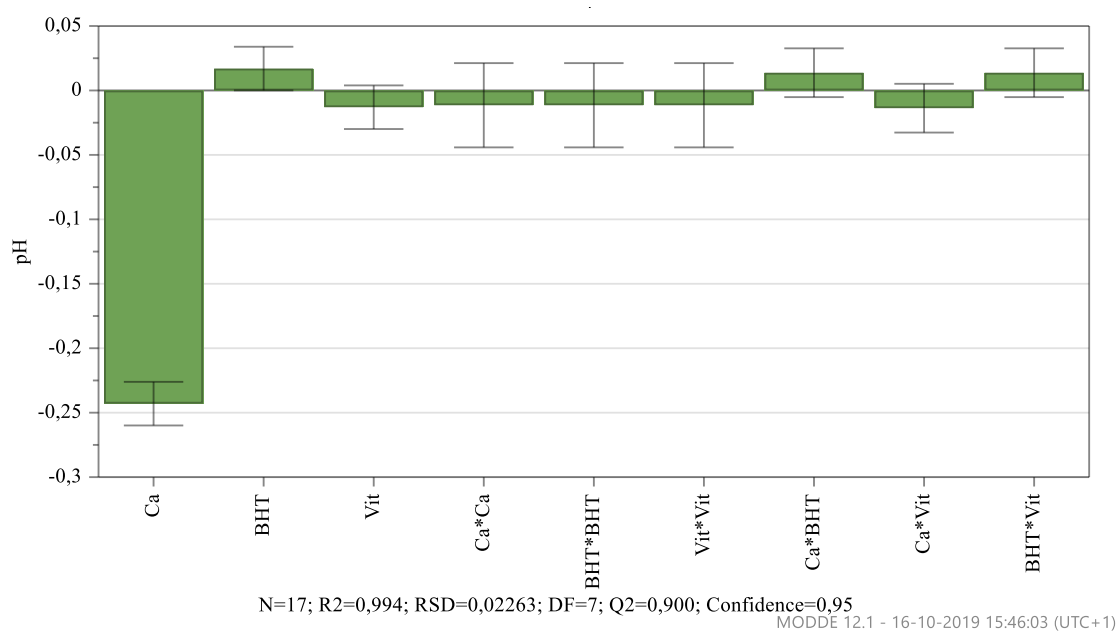


Figura B.48 - Coeficientes iniciais do modelo MLR do valor de pH – 3 meses, 40°C 75%HR

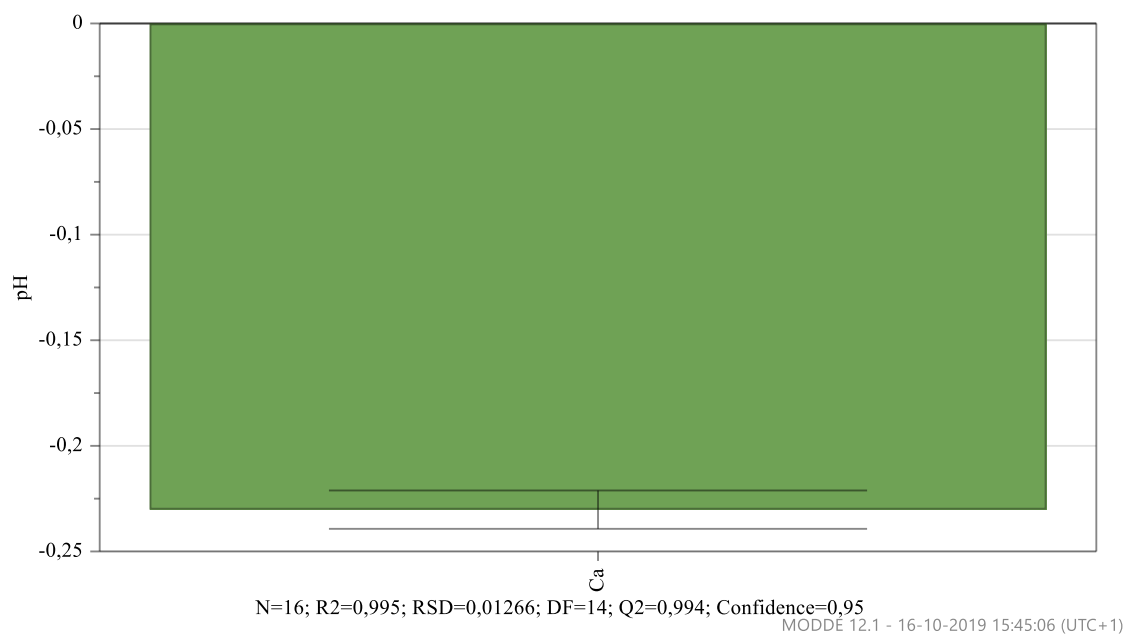


Figura B.49 - Coeficientes finais do modelo MLR do valor de pH – 3 meses, 40°C 75%HR

4. Parâmetros de reajuste do modelo

Depois de reajustado o modelo, todos os parâmetros permaneceram com valores bastante aceitáveis de validade, notando-se uma melhoria do parâmetro validade do modelo, ver Figura B.50.

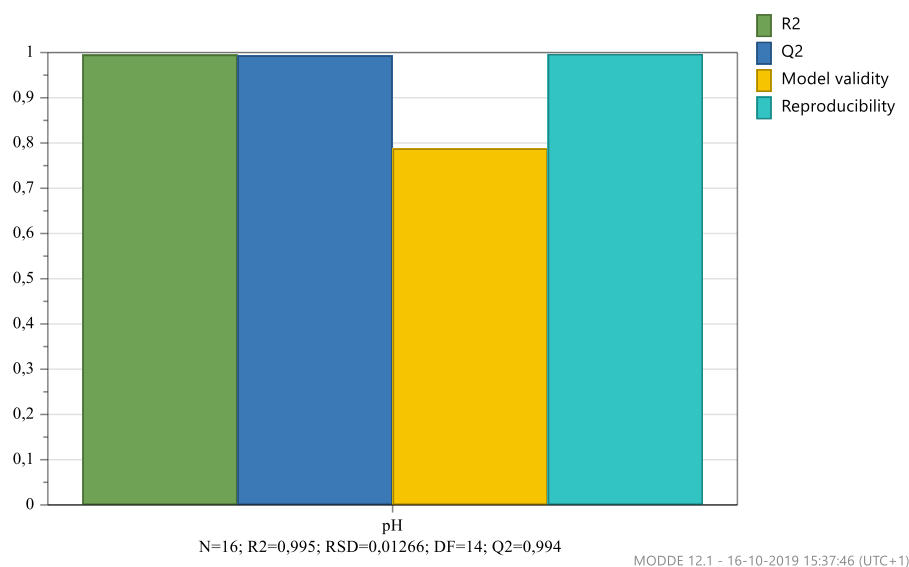


Figura B.50 - Parâmetros de reajuste do modelo MLR do valor de pH - 3 meses, 40°C 75%HR

5. Análise e interpretação do modelo

A análise de variância, ver Tabela B.7, indica que o modelo é credível e eficaz pelos seguintes factos:

- O valor da probabilidade no teste de significância da regressão linear é inferior a 0,05 (0,000) pelo que existe uma relação entre os fatores e as respostas capaz de ser descrita por uma regressão linear;
- O valor da probabilidade no teste de *lack of fit* é superior a 0,05 (0,484), o que indica não existir falta de ajuste ao modelo.

Analisando de igual forma os gráficos de resíduos e de valores observados em função dos previstos, Figura B.51 e Figura B.52, verifica-se que não existem *outliers* e que existe linearidade entre os valores observados e previstos, uma vez que os pontos se encontram junto à reta.

Tabela B.7 - Análise de variância (ANOVA) do modelo do valor de pH - 3 meses, 40°C 75%HR

| Δ (%Vit.A) | Graus de liberdade (g.l) | Soma dos quadrados (SS) | MS (SS/g.l) | F | Probabilidade (p) | Desvio Padrão |
|--|--------------------------|-------------------------|-------------|---------|-------------------|---------------|
| Total | 16 | 254,24 | 15,89 | | | |
| Constante | 1 | 253,77 | 253,77 | | | |
| Total corrigido | 15 | 0,48 | 0,032 | | | 0,178 |
| Regressão | 1 | 0,47 | 0,47 | 2955,95 | 0,000 | 0,688 |
| Residual | 14 | 0,0022 | 0,00016 | | | 0,012 |
| Lack of fit (Erro de modelo) | 12 | 0,0020 | 0,0001 | 1,70 | 0,429 | 0,013 |
| Erro puro (Erro dos replicados) | 2 | 0,0002 | 9,99e-05 | | | 0,009 |
| | N = 16 | Q ² = | 0,994 | | | |
| | g.l. = 14 | R ² = | 0,995 | RSD = | 0,01266 | |

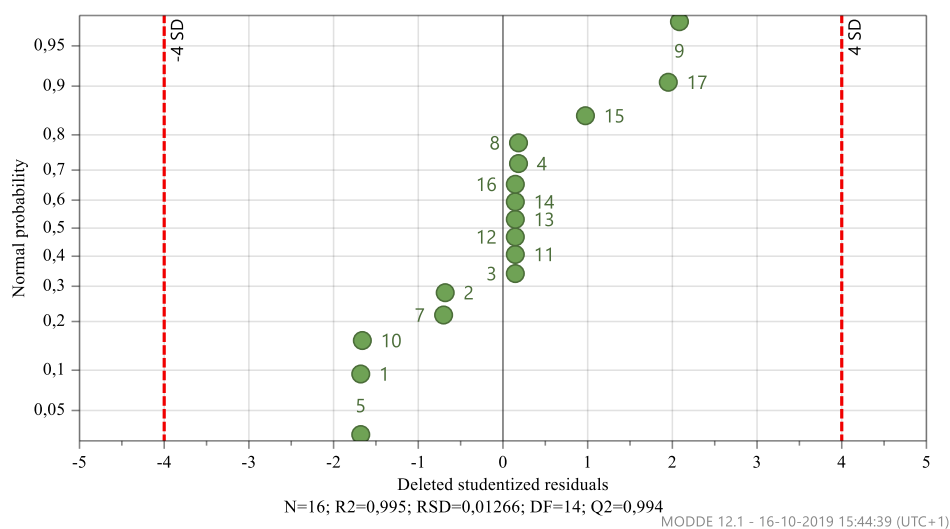


Figura B.51 - Gráficos de resíduos depois do reajuste do modelo MLR do valor de pH - 3 meses, 40°C 75%HR

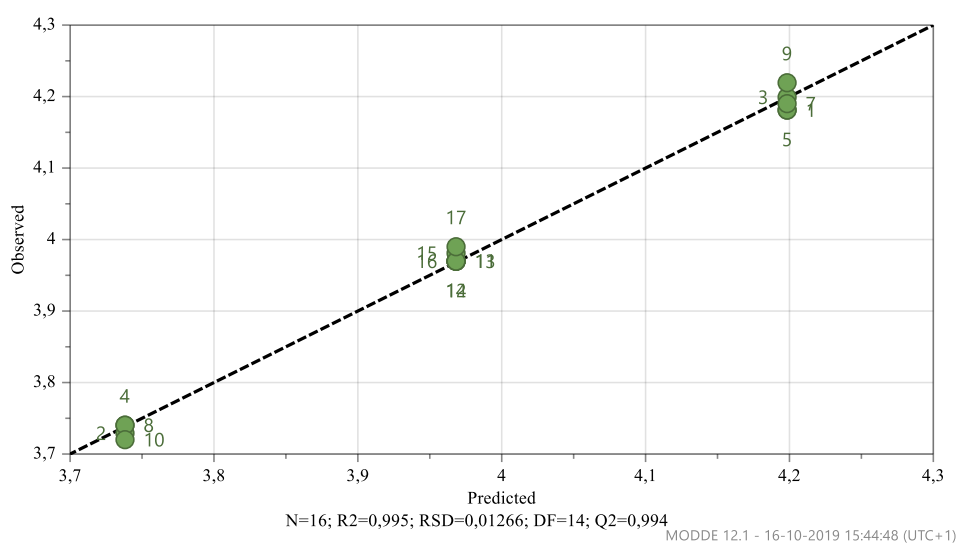


Figura B.52 - Gráfico de valores observados em função dos previstos depois do reajuste do modelo MLR do valor de pH - 3 meses, 40°C 75%HR

Modelo da quantidade de precipitado em 3 meses, armazenado a 25°C e 60%HR – Modelação do tipo MLR

A *worksheet* de fatores e respostas deste modelo corresponde à Tabela 4.7, com as respostas da variação de vitamina A após 3 meses a entrarem para este modelo.

1. Tipo de modelação: MLR

2. Parâmetros de ajuste iniciais do modelo

A Figura B.53 esquematiza os parâmetros iniciais do modelo da quantidade de precipitado após 3 meses, com as amostras armazenadas a 25°C e 60% HR. É possível verificar valores ótimos de R^2 (superior a 0,8), Q^2 (superior a 0,60) e de reprodutibilidade do ponto central.

O *software* não foi capaz de calcular o parâmetro validade do modelo devido à carência de dados suficientes, visto que apenas nos lotes com teor máximo de cálcio o valor de precipitado é diferente de 0. Mesmo tendo o parâmetro de validade do modelo em falta, procedeu-se à análise dos coeficientes não significativos.

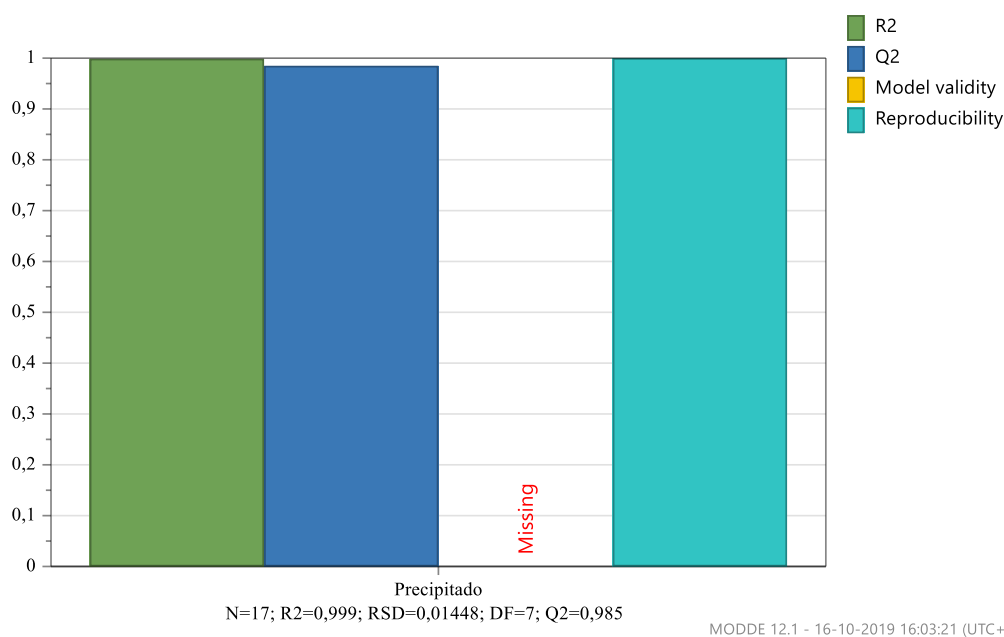


Figura B.53 - Parâmetros de ajuste iniciais do modelo MLR da quantidade de precipitado - 3 meses, 25°C 60%HR

3. Reajuste do modelo

Os gráficos de resíduos e de valores observados em função dos previstos, Figura B.54 e Figura B.55, indicam que não existem *outliers* no modelo, pelo que se prosseguiu para a análise de fatores e interações não significativas, Figura B.56.

Ao retirar os coeficientes cujos efeitos produzidos são inferiores ao intervalo de confiança de 95% - não significativos – surgiu a presença de um *outlier*, correspondente à experiência 8, que acabou por ser retirado e concluiu-se que os coeficientes significativos para o modelo da quantidade de precipitado após 3 meses a 25°C e 60% HR seriam o cloreto de cálcio e as interações cloreto de cálcio*cloreto de cálcio e cloreto de cálcio*vitamina E. A vitamina E apesar de não ser estatisticamente significativa, tem de ser mantida no modelo porque está associada a uma interação marginalmente significativa e, apesar de haver vários coeficientes significativos, os coeficientes do parâmetro cloreto de cálcio e respetiva interação (cloreto de cálcio*cloreto de cálcio) apresentam valores muito superiores aos restantes parâmetros, ver Figura B.57.

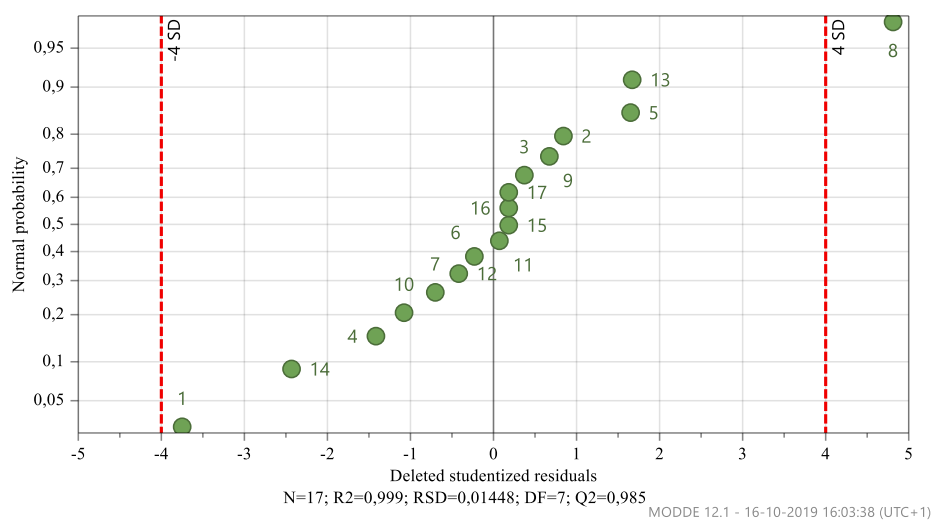


Figura B.54 - Gráficos de resíduos do modelo MLR da quantidade de precipitado - 3 meses, 25°C 60%HR

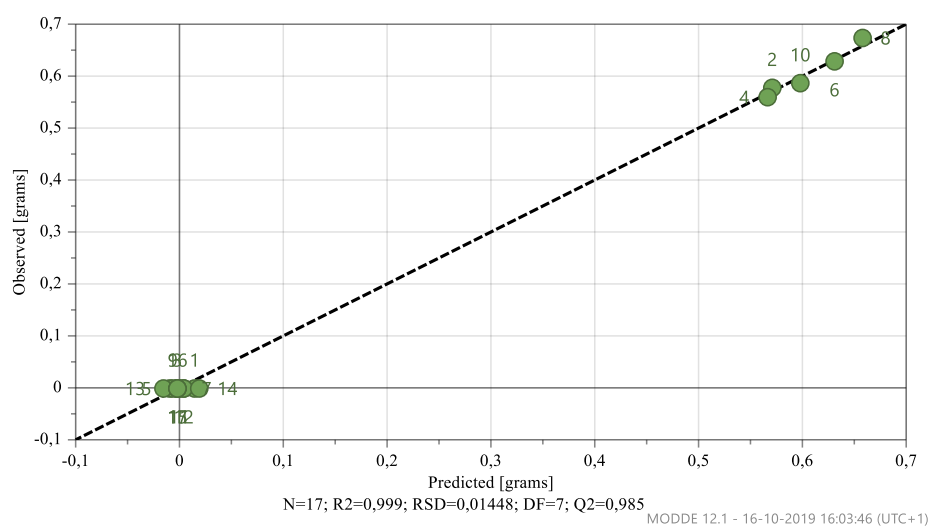


Figura B.55 - Gráfico de valores observados em função dos previstos do modelo MLR da quantidade de precipitado - 3 meses, 25°C 60%HR

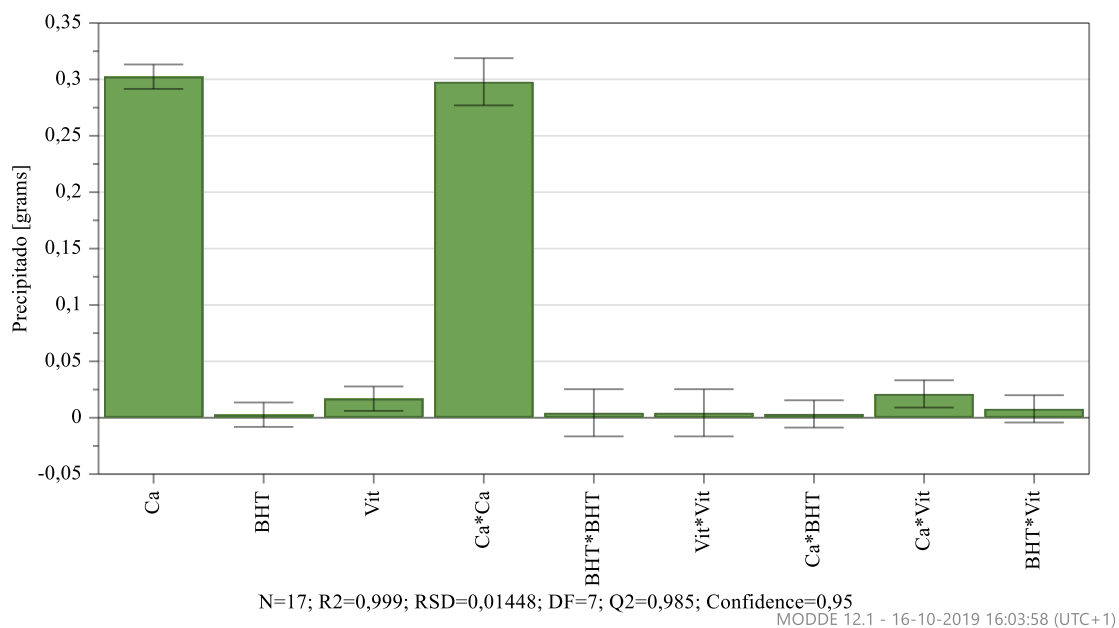


Figura B.56 - Coeficientes iniciais do modelo MLR da quantidade de precipitado – 3 meses, 25°C 60%HR

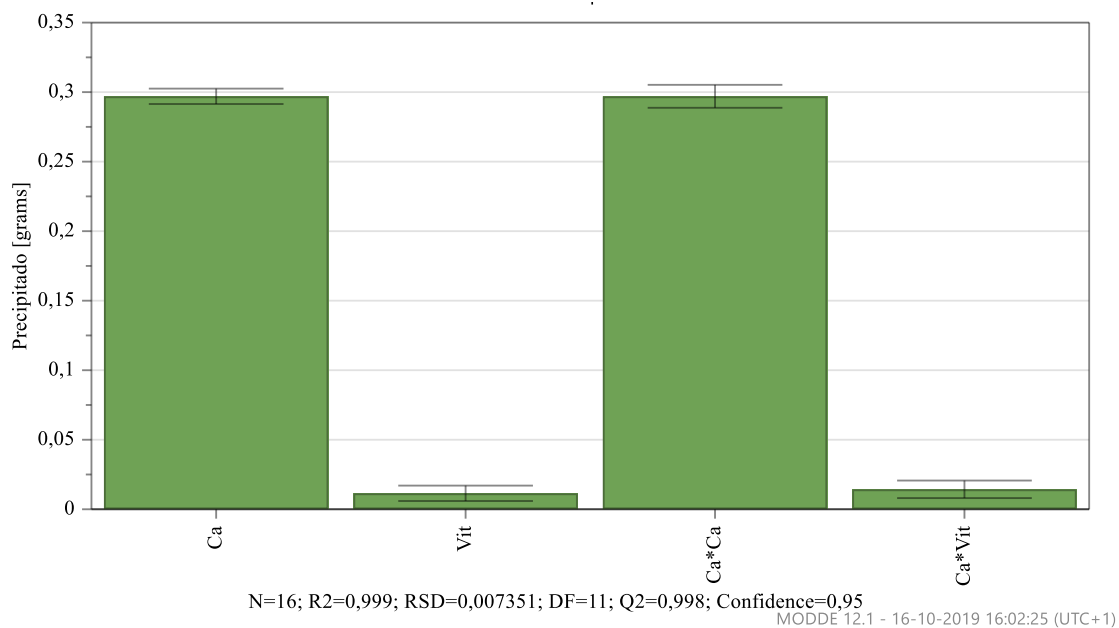


Figura B.57 - Coeficientes finais do modelo MLR da quantidade de precipitado – 3 meses, 25°C 60%HR

4. Parâmetros de reajuste do modelo

Depois de reajustado o modelo, todos os parâmetros permaneceram com valores ótimos de validade à exceção do parâmetro validade do modelo que não foi calculado, ver Figura B.58.

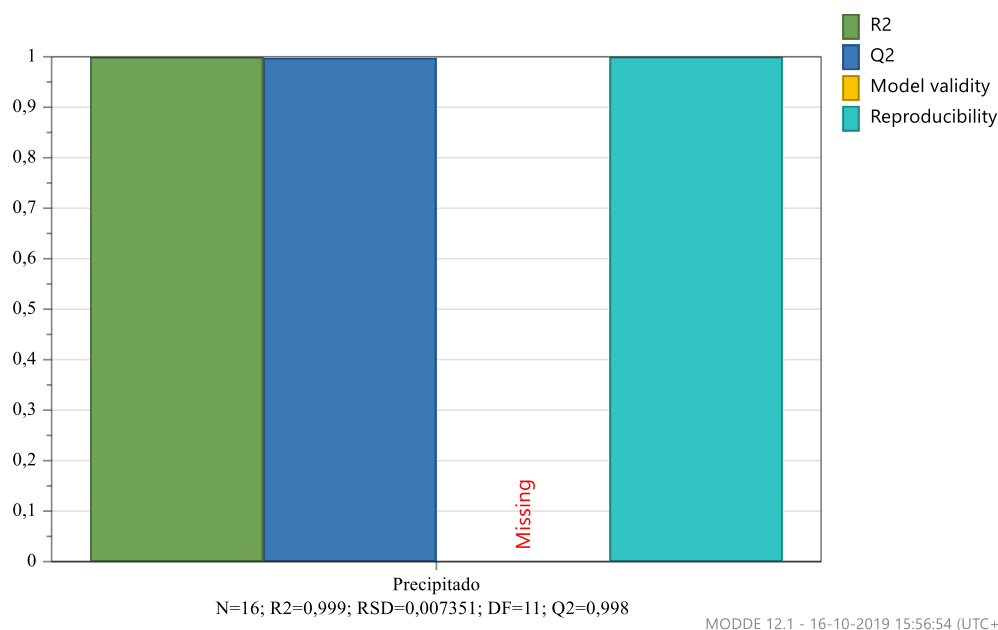


Figura B.58 - Parâmetros de reajuste do modelo MLR da quantidade de precipitado - 3 meses, 25°C 60%HR

5. Análise e interpretação do modelo

A análise de variância, ver Tabela B.8, indica que o modelo de regressão pode ser credível e eficaz por apresentar um valor de probabilidade de regressão linear inferior a 0,005 (0,000). Apesar disto, não sendo possível calcular o valor da probabilidade de *lack of fit* optou-se por não aceitar este modelo como credível para a análise de resultados.

Tabela B.8 - Análise de variância (ANOVA) do modelo da quantidade de precipitado - 3 meses, 25°C 60%HR

| Δ (%Vit.A) | Graus de liberdade (g.l) | Soma dos quadrados (SS) | MS (SS/g.l) | F | Probabilidade (p) | Desvio Padrão |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------|--------|-------------------|---------------|
| Total | 16 | 1,38 | 0,09 | | | |
| Constante | 1 | 0,35 | 0,35 | | | |
| Total corrigido | 15 | 1,05 | 0,07 | | | 0,26 |
| Regressão | 4 | 1,04 | 0,26 | 4800,9 | 0,000 | 0,51 |
| Residual | 11 | 0,0006 | 5,40e-05 | | | 0,007 |
| <i>Lack of fit</i> | 9 | 0,0006 | 6,60e-05 | -- | -- | 0,008 |
| (Erro de modelo) | | | | | | |
| Erro puro | 2 | 0 | 0 | | | -- |
| (Erro dos replicados) | | | | | | |
| | N = 16 | Q ² = | 0,998 | | | |
| | g.l. = 11 | R ² = | 0,999 | RSD = | 0,007351 | |

Modelo da quantidade de precipitado em 3 meses, armazenado a 40°C e 75%HR – Modelação do tipo MLR

A *worksheet* de fatores e respostas deste modelo corresponde à Tabela 4.8, com as respostas da variação de vitamina A após 3 meses a entrarem para este modelo.

1. Tipo de modelação: MLR

2. Parâmetros de ajuste iniciais do modelo

A Figura B.59 esquematiza os parâmetros iniciais do modelo da quantidade de precipitado após 3 meses, com as amostras armazenadas a 40°C e 75% HR. É possível verificar valores ótimos de R^2 (superior a 0,8), Q^2 (superior a 0,60) e de reprodutibilidade do ponto central.

O *software* não foi capaz de calcular o parâmetro validade do modelo devido à carência de dados suficientes, visto que apenas nos lotes com teor máximo de cálcio o valor de precipitado é diferente de 0. Mesmo tendo o parâmetro de validade do modelo em falta, procedeu-se à análise dos coeficientes não significativos.

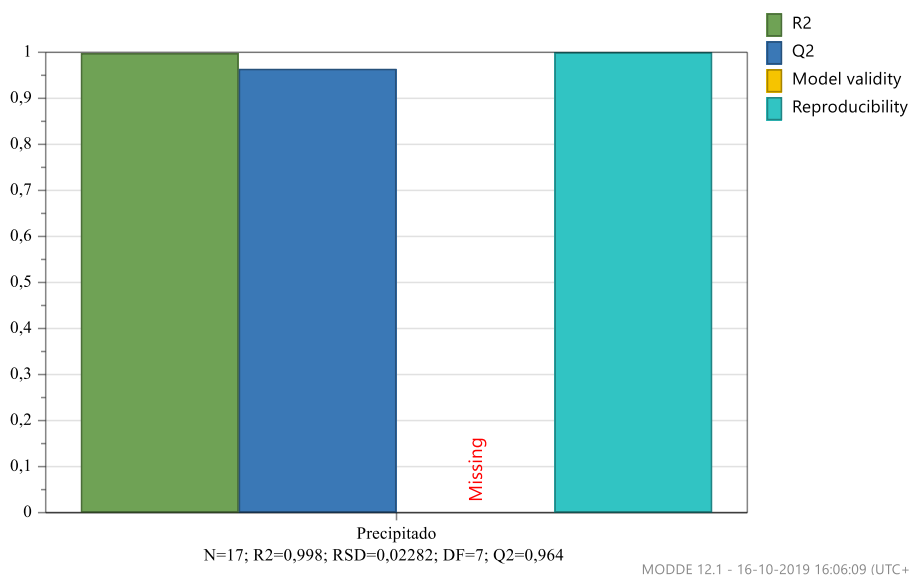


Figura B.59 - Parâmetros de ajuste iniciais do modelo MLR da quantidade de precipitado - 3 meses, 40°C 75%HR

3. Reajuste do modelo

Os gráficos de resíduos e de valores observados em função dos previstos, Figura B.60 e Figura B.61, indicam que existe um *outlier*, experiência 6, no modelo. Apesar de se encontrar 4 desvios padrão fora do valor previsto, esta experiência não foi retirada por fazer parte do grupo das experiências que continham cloreto de cálcio no valor máximo e como tal apresentar valor de precipitado. Por outro lado, assim que se deu início à remoção de interações não significativas, Figura B.62, esta experiência deixou de imediato de ser considerado *outlier* estatisticamente.

Assim, concluiu-se que os coeficientes significativos para o modelo da quantidade de precipitado após 3 meses a 40°C e 75% HR seriam o cloreto de cálcio e as interações cloreto de cálcio*cloreto de cálcio e BHT*vitamina E. O BHT e a vitamina E apesar de não serem estatisticamente significativos, têm de ser mantidos no modelo porque um coeficiente marginalmente significativo está associado à interação destes dois fatores (BHT*vitamina E), ver Figura B.63.

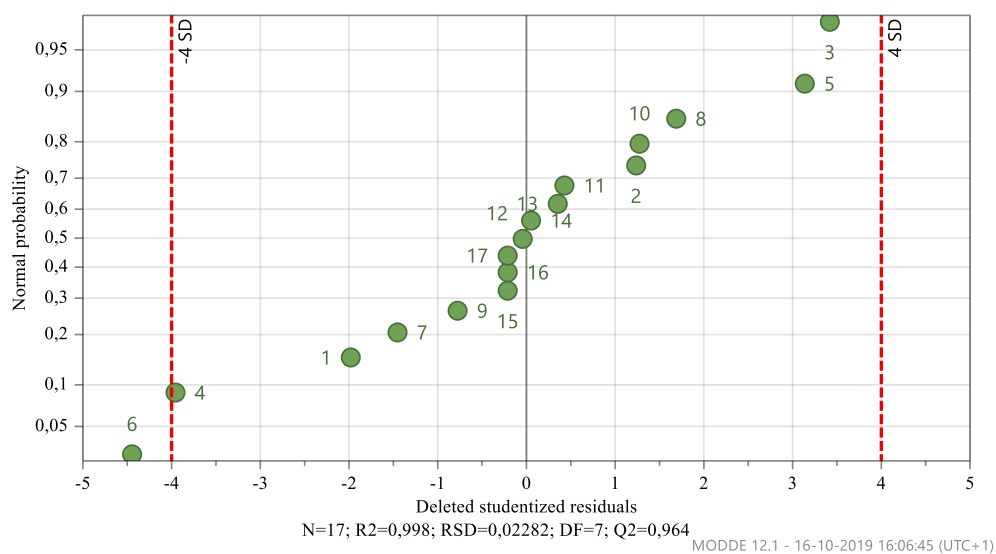


Figura B.60 - Gráficos de resíduos do modelo MLR da quantidade de precipitado - 3 meses, 40°C 75%HR

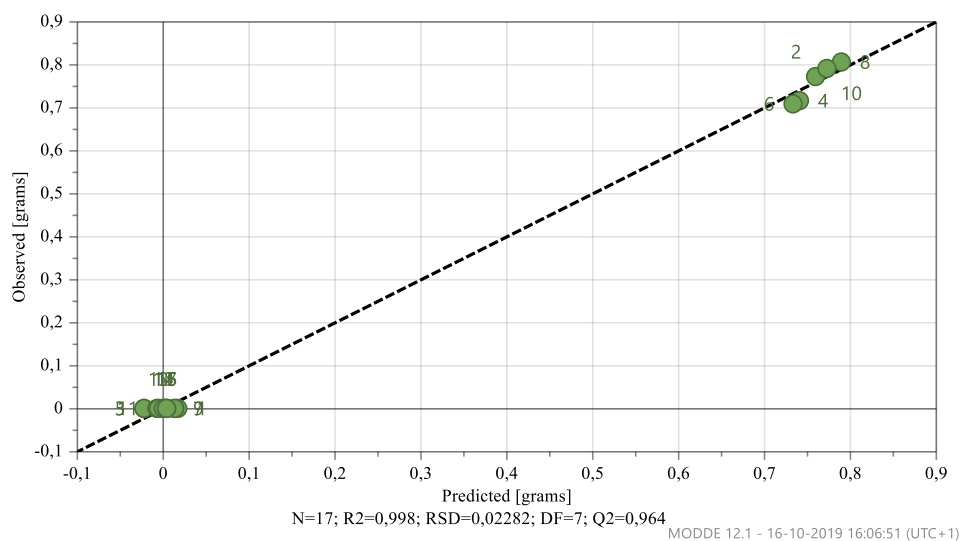


Figura B.61 - Gráfico de valores observados em função dos previstos do modelo MLR da quantidade de precipitado - 3 meses, 40°C 75%HR

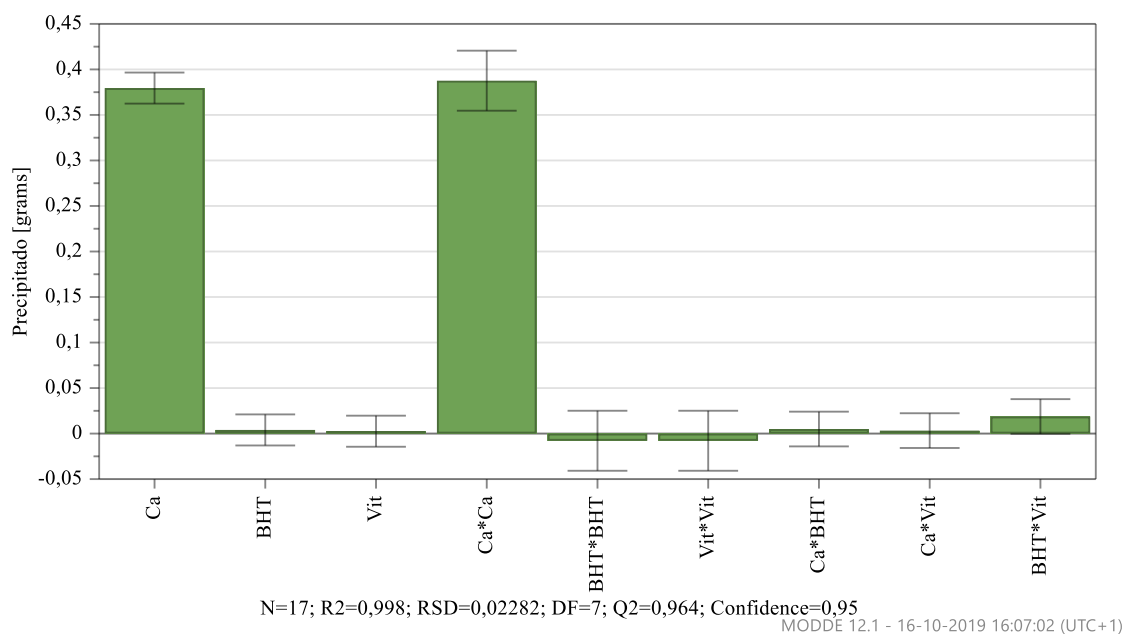


Figura B.62 - Coeficientes iniciais do modelo MLR da quantidade de precipitado – 3 meses, 40°C 75%HR

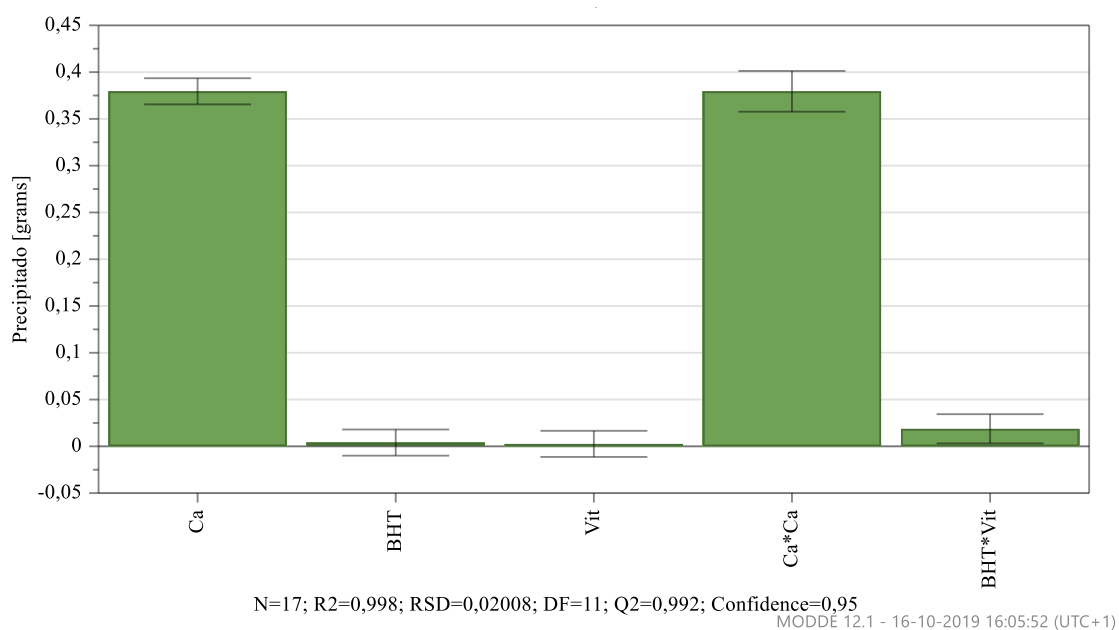


Figura B.63 - Coeficientes finais do modelo MLR da quantidade de precipitado – 3 meses, 40°C 75%HR

4. Parâmetros de reajuste do modelo

Depois de reajustado o modelo, todos os parâmetros permaneceram com valores ótimos de validade à exceção do parâmetro validade do modelo que não foi calculado, ver Figura B.64.

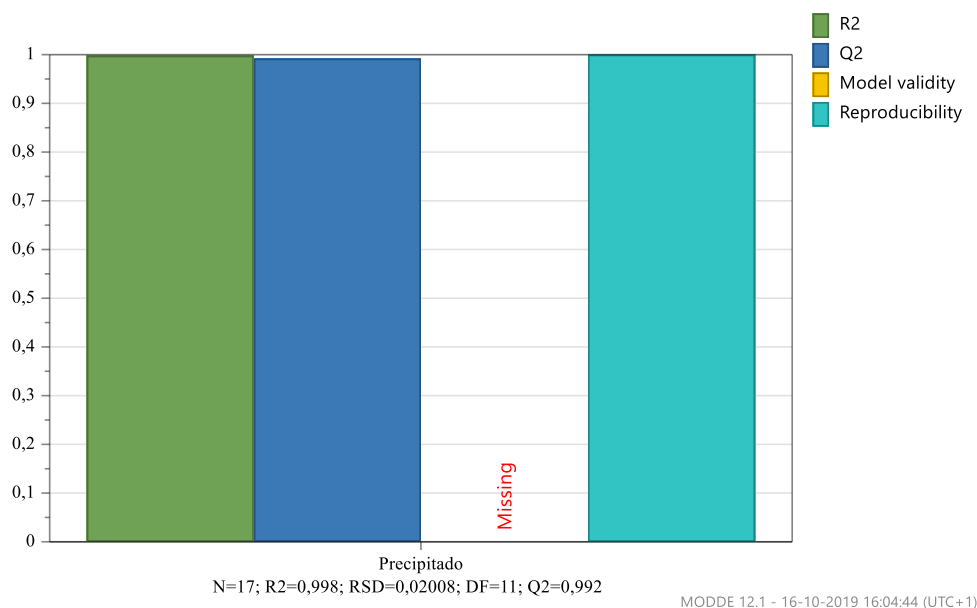


Figura B.64 - Parâmetros de reajuste do modelo MLR da quantidade de precipitado - 3 meses, 40°C 75%HR

5. Análise e interpretação do modelo

A análise de variância, ver Tabela B.9, indica que o modelo pode ser credível e eficaz por apresentar um valor de probabilidade de regressão linear inferior a 0,005 (0,000). Apesar disto, não sendo possível calcular o valor da probabilidade de *lack of fit* optou-se por não aceitar este modelo como credível para a análise de resultados.

Tabela B.9 - Análise de variância (ANOVA) do modelo da quantidade de precipitado - 3 meses, 40°C 75%HR

| Δ (%Vit.A) | Graus de liberdade (g.l) | Soma dos quadrados (SS) | MS (SS/g.l) | F | Probabilidade (p) | Desvio Padrão |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------|---------|-------------------|---------------|
| Total | 17 | 2,88788 | 0,169875 | | | |
| Constante | 1 | 0,84718 | 0,847178 | | | |
| Total corrigido | 16 | 2,04 | 0,12 | | | 0,36 |
| Regressão | 5 | 2,04 | 0,41 | 1010,35 | 0,000 | 0,64 |
| Residual | 11 | 0,0044 | 0,0004 | | | 0,02 |
| <i>Lack of fit</i> | 9 | 0,0044 | 0,0005 | -- | -- | 0,02 |
| (Erro de modelo) | | | | | | |
| Erro puro | 2 | 0 | 0 | | | -- |
| (Erro dos replicados) | | | | | | |
| | N = 17 | Q2 = | 0,992 | | | |
| | g.l = 11 | R2 = | 0,998 | RSD = | 0,02008 | |

Apêndice C – Validação analítica do método de doseamento de vitamina A

Validação analítica do método de doseamento de vitamina A

- Parâmetro - Seletividade

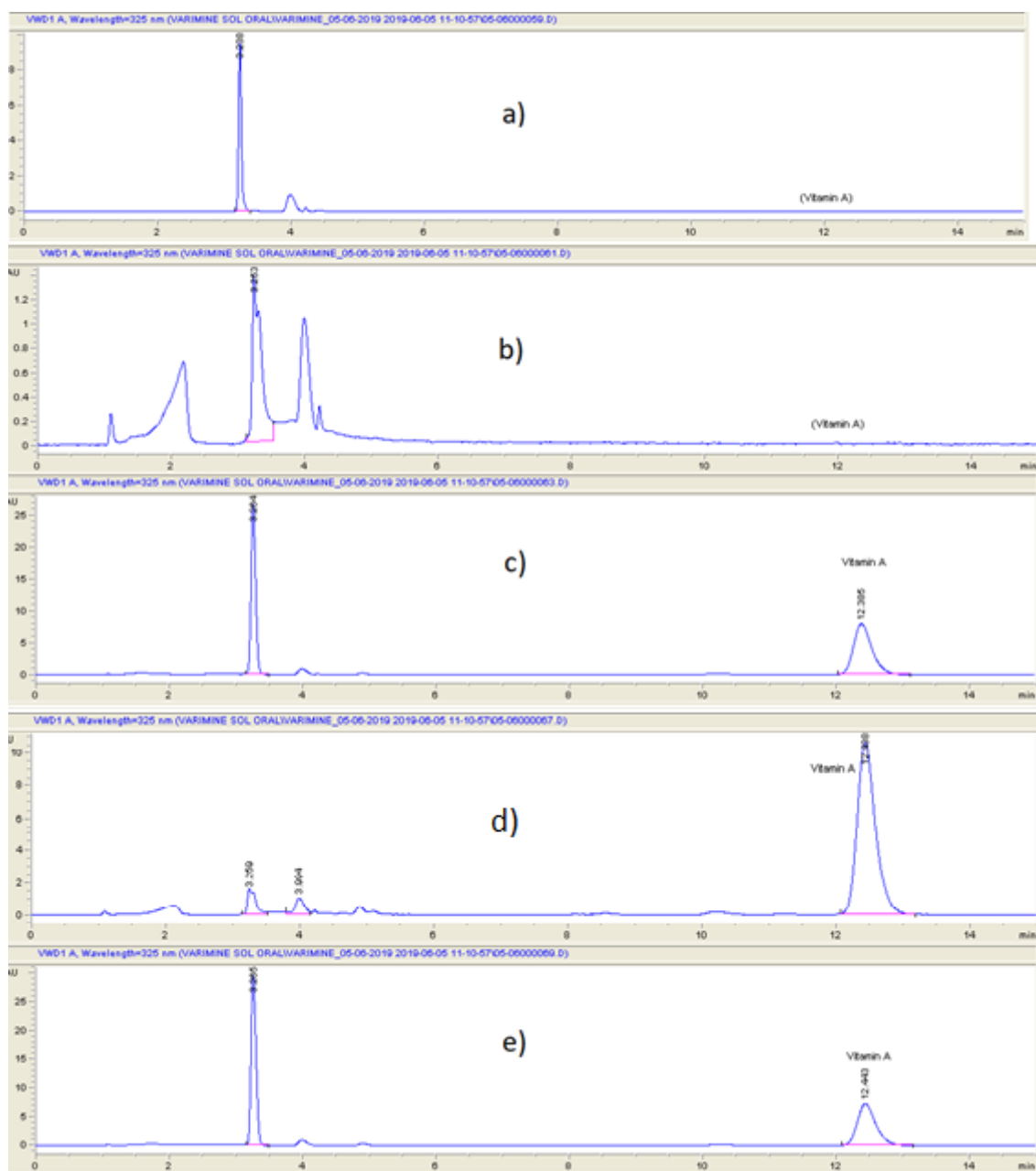


Figura C.1 – Cromatogramas do parâmetro da seletividade da vitamina A: a) Solvente; b) Placebo de vitamina A; c) Vitamina A (matéria-prima); d) Produto acabado; e) Padrão de vitamina A.

Tabela C.1 - Tabela de seletividade para o método de doseamento de vitamina A

| Amostra | Descrição | TR | Área | Resolução |
|---------|----------------------------|--------|-----------|-----------|
| a) | Solvente | 3,238 | 29,50544 | --- |
| b) | Placebo | 3,253 | 13,09019 | --- |
| c) | Vitamina A (matéria-prima) | 3,264 | 126,64187 | --- |
| | | 12,385 | 153,95313 | 29,72 |
| d) | Produto acabado | 3,259 | 14,61224 | --- |
| | | 3,994 | 10,85206 | 3,25 |
| | | 12,438 | 203,73412 | 22,88 |
| e) | Padrão vitamina A | 3,265 | 154,22227 | --- |
| | | 12,443 | 140,93170 | 29,20 |

- **Parâmetro - Linearidade**

Tabela C.2 - Resultados da linearidade - Vitamina A

| Resultados | | | | | | |
|------------|-----------|---|---------------|-------------|-----------------|------------|
| N | 5 | Factor resposta do nível de especificação | | | 61292 | |
| Ensaio | Nível (%) | FD (ml) | Conc. (mg/ml) | Sinal médio | Factor resposta | Desvio (%) |
| 1 | 82% | 12500 | 0,0021 | 127,544695 | 61320 | 0,05 |
| 2 | 102% | 10000 | 0,0026 | 159,35894 | 61292 | 0,00 |
| 3 | 122% | 8333 | 0,0031 | 193,07736 | 61884 | 0,97 |
| 4 | 143% | 7143 | 0,0036 | 223,76976 | 61475 | 0,30 |
| 5 | 163% | 6250 | 0,0042 | 256,67282 | 61700 | 0,67 |
| Média | | | 0,003 | 192,084715 | 61534 | - |
| Máximo | | | 0,004 | 256,67282 | 61884 | 0,97 |
| Mínimo | | | 0,002 | 127,544695 | 61292 | 0,00 |
| RSD | | | - | - | 0,41 | - |

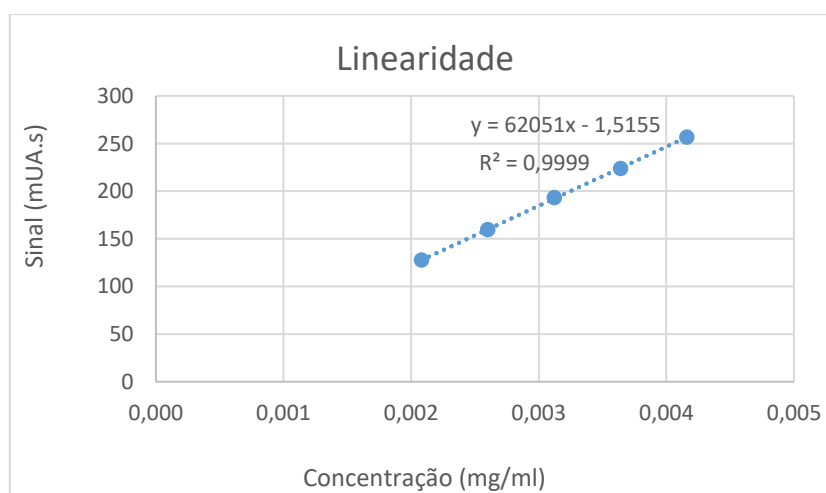


Figura C.2 - Reta de regressão linear – Linearidade Vitamina A

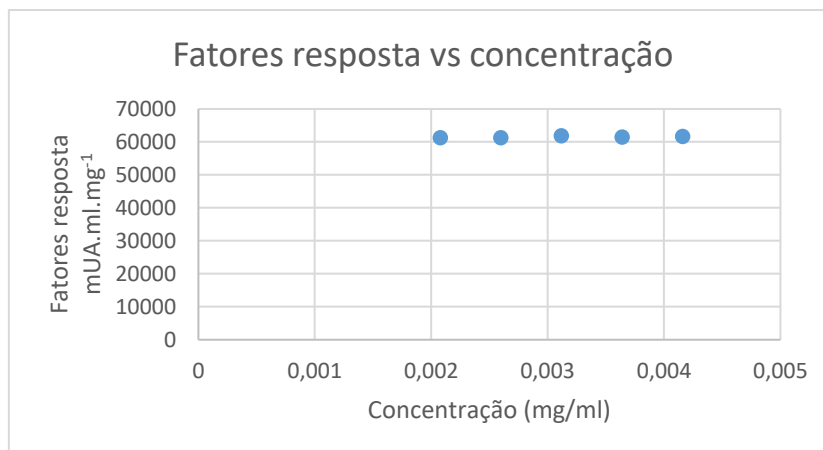


Figura C.3 - Fatores resposta em função da concentração - Linearidade vitamina A

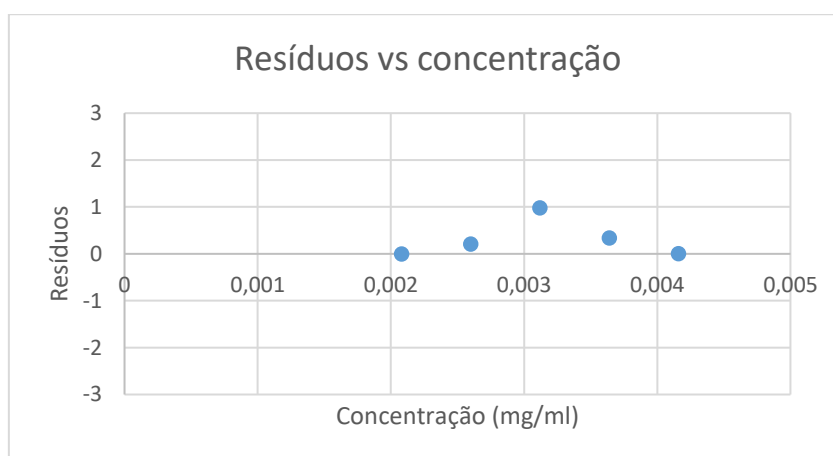


Figura C.4 - Resíduos em função da concentração - Linearidade vitamina A

Parâmetro - Precisão

Tabela C.3 - Resultados da precisão do sistema - Vitamina A

| Padrão | | | | | |
|---------------|----------------------|--------------|-------------|-------------------|-------------|
| Injeção | Tempo retenção (min) | N | Simetria | Sinal analítico | Resolução |
| 1 | 12,527 | 10972 | 0,95 | 163,48064 | 33,81 |
| 2 | 12,554 | 11019 | 0,96 | 162,78995 | 33,92 |
| 3 | 12,568 | 10855 | 0,96 | 163,33694 | 33,77 |
| 4 | 12,600 | 11099 | 0,95 | 162,39737 | 34,07 |
| 5 | 12,571 | 11049 | 0,96 | 162,6743 | 33,99 |
| 6 | 12,537 | 11181 | 0,95 | 162,47227 | 34,14 |
| 7 | 12,488 | 11289 | 0,95 | 162,18138 | 34,21 |
| 8 | 12,390 | 11309 | 0,95 | 162,08733 | 34,14 |
| 9 | 12,538 | 10990 | 0,95 | 161,89375 | 33,76 |
| 10 | 12,574 | 10866 | 0,95 | 161,76781 | 33,75 |
| Média | 12,535 | 11063 | 0,95 | 162,508174 | 34,0 |
| Máximo | 12,600 | 11309 | 0,96 | 163,48064 | 34,2 |
| Mínimo | 12,390 | 10855 | 0,95 | 161,76781 | 33,8 |
| RSD | 0,47 | 1,43 | 0,51 | 0,35 | 0,52 |

Tabela C.4 - Resultados da repetibilidade e precisão intermédia - Vitamina A

| Amostra | | | | | |
|---------------------|-----------|-------------|-----------------|-----------------|---------------|
| Peso médio (mg) | 237400,00 | Volume (ml) | 200 | Peso médio /5ml | 5 935,00 |
| Ensaio | Área/Abs. | Toma / mg | Factor Diluição | Teor (%) | Teor (mg/5ml) |
| 1 | 226,36478 | 1817,27 | 50 | 141,0 | 599,4 |
| 2 | 223,09454 | 1788,57 | 50 | 141,2 | 600,2 |
| 3 | 223,48563 | 1792,22 | 50 | 141,2 | 600,0 |
| 4 | 225,11948 | 1806,09 | 50 | 141,1 | 599,8 |
| 5 | 224,48286 | 1794,32 | 50 | 141,7 | 602,0 |
| 6 | 224,69337 | 1801,24 | 50 | 141,2 | 600,3 |
| Média | - | - | - | 141,2 | 600,3 |
| RSD | - | - | - | 0,15 | 0,15 |
| 7 | 232,53328 | 1866,45 | 50 | 141,2 | 600,2 |
| 8 | 224,43343 | 1793,51 | 50 | 141,9 | 602,9 |
| 9 | 220,50816 | 1773,35 | 50 | 141,0 | 599,1 |
| 10 | 224,23599 | 1800,76 | 50 | 141,2 | 599,9 |
| 11 | 227,80441 | 1825,40 | 50 | 141,5 | 601,3 |
| 12 | 226,01767 | 1820,64 | 50 | 140,7 | 598,1 |
| Média | - | - | - | 141,2 | 600,3 |
| RSD | - | - | - | 0,28 | 0,28 |
| Média total | - | - | - | 141,2 | 600,3 |
| Máximo total | - | - | - | 141,9 | 602,9 |
| Mínimo total | - | - | - | 140,7 | 598,1 |
| RSD total | - | - | - | 0,21 | 0,21 |

Parâmetro - Exatidão

Tabela C.5 - Resultados da exatidão - Vitamina A

| Resultados - | | | Filtração | |
|---------------------|-----------|-------------------------|-------------------------|-----------------|
| Ensaio | Nível (%) | Analito adicionado (mg) | Analito recuperado (mg) | Recuperação (%) |
| 1 | 77,92 | 19,9 | 20,1 | 101,1 |
| 2 | 77,92 | 19,9 | 20,2 | 101,5 |
| 3 | 77,92 | 19,9 | 20,0 | 100,7 |
| Média | - | - | - | 101,1 |
| RSD | - | - | - | 0,35 |
| 4 | 99,61 | 25,4 | 25,8 | 101,6 |
| 5 | 99,61 | 25,4 | 25,9 | 102,0 |
| 6 | 99,61 | 25,4 | 26,1 | 102,7 |
| Média | - | - | - | 102,1 |
| RSD | - | - | - | 0,56 |
| 7 | 158,71 | 40,5 | 41,3 | 102,1 |
| 8 | 158,71 | 40,5 | 41,3 | 101,9 |
| 9 | 158,71 | 40,5 | 41,4 | 102,4 |
| Média | - | - | - | 102,2 |
| RSD | - | - | - | 0,21 |
| Média total | - | - | - | 101,8 |
| Máximo | - | - | - | 102,7 |
| Mínimo | - | - | - | 100,7 |
| RSD total | - | - | - | 0,62 |

Apêndice D – Validação analítica do método de doseamento de vitamina E

- Parâmetro – Seletividade

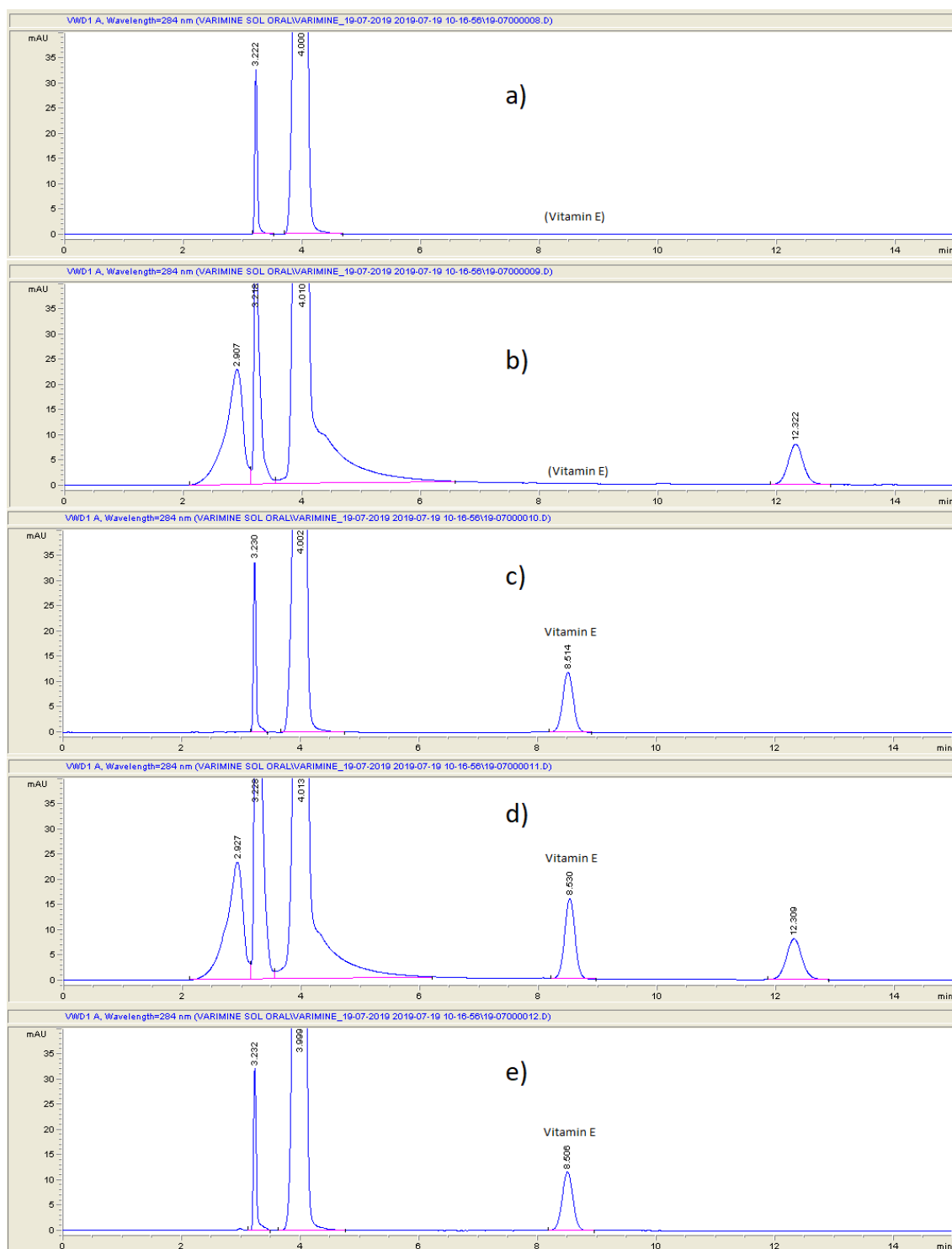


Figura D.1 - Cromatogramas do parâmetro da seletividade da vitamina E: a) Solvente; b) Placebo de vitamina E; c) Vitamina E (matéria-prima); d) Produto acabado; e) Padrão de vitamina E.

Tabela D.1 - Tabela de seletividade para o método de doseamento de vitamina E

| Amostra | Descrição | TR | Área | Resolução |
|---------|----------------------------|--------|------------|-----------|
| a) | Solvente | 3,222 | 97,25427 | - |
| | | 4,000 | 5001,85156 | 5,30 |
| b) | Placebo | 2,907 | 474,13461 | - |
| | | 3,218 | 351,25113 | 1,03 |
| | | 4,010 | 5446,27539 | 4,61 |
| | | 12,322 | 143,95456 | 24,54 |
| c) | Vitamina E (matéria-prima) | 3,23 | 108,40794 | - |
| | | 4,002 | 4928,60059 | 5,26 |
| | | 8,514 | 146,75240 | 16,68 |
| d) | Produto acabado | 2,927 | 460,81509 | - |
| | | 3,228 | 553,98938 | 0,81 |
| | | 4,013 | 5340,76465 | 3,17 |
| | | 8,530 | 192,03262 | 17,00 |
| | | 12,309 | 148,81308 | 9,55 |
| e) | Padrão de Vitamina E | 3,232 | 108,62473 | - |
| | | 3,999 | 4961,87061 | 4,97 |
| | | 8,506 | 146,02034 | 16,05 |

- **Parâmetro – Linearidade**

Tabela D.2 - Resultados da linearidade - Vitamina E

| Resultados | | | | | | |
|------------|-----------|---|---------------|-------------|-----------------|------------|
| N | 5 | Factor resposta do nível de especificação | | | 11767 | |
| Ensaio | Nível (%) | FD (ml) | Conc. (mg/ml) | Sinal médio | Factor resposta | Desvio (%) |
| 1 | 83% | 2500 | 0,010 | 115,2439 | 11524 | -2,06 |
| 2 | 104% | 2000 | 0,013 | 147,08539 | 11767 | 0,00 |
| 3 | 125% | 1667 | 0,015 | 175,01677 | 11668 | -0,84 |
| 4 | 146% | 1429 | 0,018 | 201,87029 | 11535 | -1,97 |
| 5 | 167% | 1250 | 0,020 | 232,45316 | 11623 | -1,23 |
| Média | | | 0,015 | 174,333902 | 11623 | - |
| Máximo | | | 0,020 | 232,45316 | 11767 | 0,00 |
| Mínimo | | | 0,010 | 115,2439 | 11524 | -2,06 |
| RSD | | | - | - | 0,86 | - |

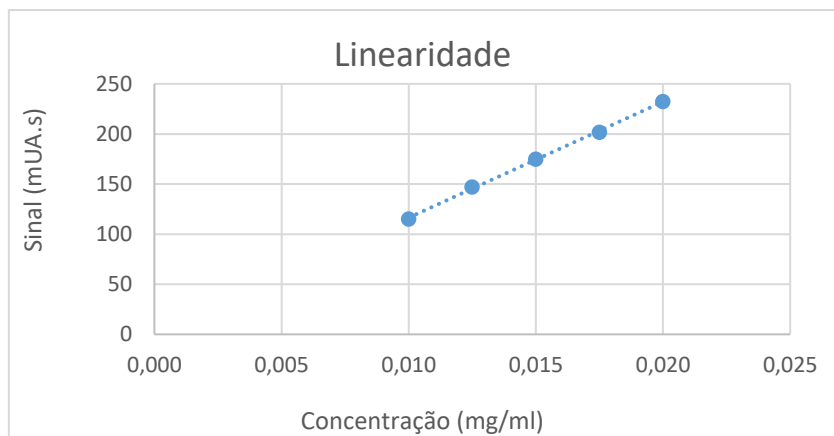


Figura D.2 - Reta de regressão linear – Linearidade Vitamina E

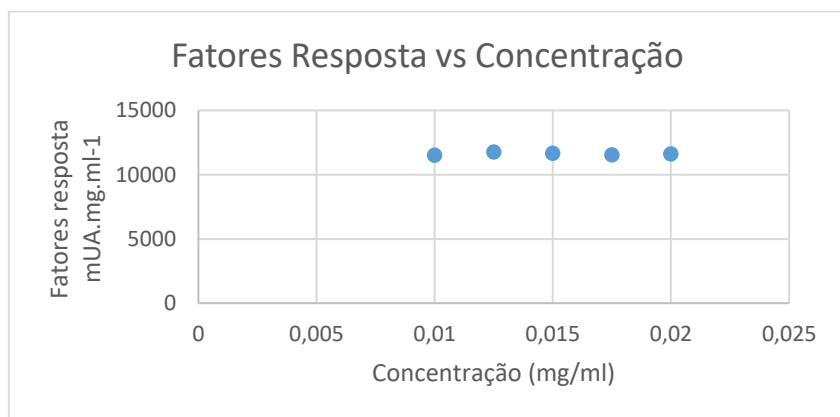


Figura D.3 - Fatores resposta em função da concentração - Linearidade vitamina E

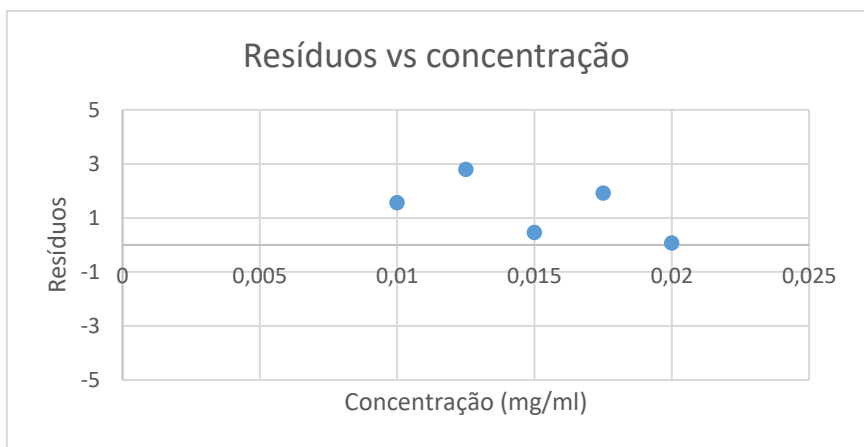


Figura D.4 - Resíduos em função da concentração - Linearidade vitamina E

Parâmetro – Precisão

Tabela D.3 - Resultados da precisão do sistema - Vitamina E

| Padrão | | | | | |
|---------------|----------------------|--------------|-------------|-------------------|-------------|
| Injecção | Tempo retenção (min) | N | Simetria | Sinal analítico | Resolução |
| 1 | 8,497 | 11358 | 0,97 | 147,39175 | 2,12 |
| 2 | 8,500 | 11564 | 0,97 | 147,3268 | 2,12 |
| 3 | 8,519 | 11616 | 0,97 | 147,64513 | 2,12 |
| 4 | 8,463 | 11463 | 0,97 | 147,38811 | 2,12 |
| 5 | 8,494 | 11350 | 0,97 | 147,56209 | 2,12 |
| 6 | 8,517 | 11411 | 0,97 | 147,58096 | 2,13 |
| 7 | 8,560 | 11729 | 0,96 | 148,10579 | 2,12 |
| 8 | 8,469 | 11481 | 0,97 | 147,71912 | 2,12 |
| 9 | 8,588 | 11602 | 0,97 | 148,2963 | 2,12 |
| 10 | 8,485 | 11726 | 0,96 | 148,25317 | 2,11 |
| Média | 8,509 | 11530 | 0,97 | 147,726922 | 2,1 |
| Máximo | 8,588 | 11729 | 0,97 | 148,2963 | 2,1 |
| Mínimo | 8,463 | 11350 | 0,96 | 147,3268 | 2,1 |
| RSD | 0,46 | 1,21 | 0,44 | 0,25 | 0,22 |

Tabela D.4 - Resultados da repetibilidade e precisão intermédia - Vitamina E

| Amostra | | | | | |
|---------------------|-----------|-------------|-----------------|-----------------|---------------|
| Peso médio (mg) | 237400 | Volume (ml) | 200 | Peso médio /5ml | 5 935,00 |
| Ensaio | Área/Abs. | Toma / mg | Factor Diluição | Teor (%) | Teor (mg/5ml) |
| 1 | 194,88217 | 1810,66 | 50 | 133,7 | 2,7 |
| 2 | 193,18153 | 1796,31 | 50 | 133,6 | 2,7 |
| 3 | 193,53159 | 1796,31 | 50 | 133,8 | 2,7 |
| 4 | 194,27156 | 1796,48 | 50 | 134,3 | 2,7 |
| 5 | 195,98175 | 1818,64 | 50 | 133,8 | 2,7 |
| 6 | 193,01271 | 1791,66 | 50 | 133,8 | 2,7 |
| Média | - | - | - | 133,8 | 2,7 |
| RSD | - | - | - | 0,19 | 0,19 |
| 7 | 196,22194 | 1824,21 | 50 | 135,9 | 2,7 |
| 8 | 196,92488 | 1824,87 | 50 | 136,3 | 2,7 |
| 9 | 200,39412 | 1852,04 | 50 | 136,7 | 2,7 |
| 10 | 194,76213 | 1824,66 | 50 | 134,9 | 2,7 |
| 11 | 196,59447 | 1831,96 | 50 | 135,6 | 2,7 |
| 12 | 195,80722 | 1818,24 | 50 | 136,1 | 2,7 |
| Média | - | - | - | 135,9 | 2,7 |
| RSD | - | - | - | 0,47 | 0,47 |
| Média total | - | - | - | 134,9 | 2,7 |
| Máximo total | - | - | - | 136,7 | 2,7 |
| Mínimo total | - | - | - | 133,6 | 2,7 |
| RSD total | - | - | - | 0,88 | 0,88 |

Parâmetro – Exatidão

Tabela D.5 - Resultados da exatidão - Vitamina E

| Resultados - | | | | |
|---------------------|-----------|-------------------------|-------------------------|--------------|
| Ensaio | Nível (%) | Analito adicionado (mg) | Analito recuperado (mg) | Recuper. (%) |
| 1 | 80,00 | 19,2 | 19,2 | 100,0 |
| 2 | 80,00 | 19,2 | 19,1 | 99,7 |
| 3 | 80,00 | 19,2 | 19,0 | 99,0 |
| Média | - | - | - | 99,6 |
| RSD | - | - | - | 0,49 |
| 4 | 98,75 | 23,7 | 23,3 | 98,3 |
| 5 | 98,75 | 23,7 | 23,3 | 98,4 |
| 6 | 98,75 | 23,7 | 23,4 | 98,6 |
| Média | - | - | - | 98,4 |
| RSD | - | - | - | 0,16 |
| 7 | 161,25 | 38,7 | 38,2 | 98,6 |
| 8 | 161,25 | 38,7 | 37,9 | 98,0 |
| 9 | 161,25 | 38,7 | 38,0 | 98,1 |
| Média | - | - | - | 98,2 |
| RSD | - | - | - | 0,30 |
| Média total | - | - | - | 98,7 |
| Máximo | - | - | - | 100,0 |
| Mínimo | - | - | - | 98,0 |
| RSD total | - | - | - | 0,70 |